

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID



Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN NECROPSIAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Realizada por Lucía Galán Dávila

Dirigida por Jorge Matías-Guiu Guía

Departamento de Medicina de la
Universidad Complutense de Madrid

José Manuel García Verdugo

Departamento de Biología Celular
Universidad de Valencia

Ulises Gómez Pinedo

Instituto de Neurociencias
Hospital Clínico San Carlos

PROGRAMA DE NEUROCIENCIAS

Departamento de Psiquiatría

Madrid, octubre de 2015

A mi madre.

A mi hija.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo:

A Jorge Matías-Guiu, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su tutela y haberme guiado de forma constante y estructurada en la realización de la misma, ofreciéndome su inestimable experiencia y su apoyo incondicional.

A José Manuel García Verdugo, por haber co-tutelado este proyecto y haberme introducido en el apasionante campo de la neurogénesis del adulto, acercándome al mundo de la neurobiología.

A Ulises Gómez Pinedo, por su trabajo y su dedicación, por su gran paciencia y disponibilidad. Sin él no habría sido posible llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros de la Unidad de Esclerosis Lateral Amiotrófica del Hospital Clínico San Carlos Antonio Guerrero, Alejandro Horga y Álvaro Vela por su implicación en el proyecto y su colaboración para obtener la donación de los tejidos y poner a mi disposición todos los datos clínicos. También por haberme permitido hacer compatible este trabajo con mi asistencia clínica y por su constante disposición a ayudarme.

A Armando Martínez, por su colaboración en la realización de los estudios de necropsia de los pacientes y la extracción de los tejidos.

A Rocío García-Ramos, por sus consejos y su apoyo para la culminación de este estudio.

A Pedro López, por sus ilustraciones en esta tesis doctoral.

A todos mis compañeros del Servicio de Neurología del Hospital Clínico San Carlos, que ,con su alto nivel científico y personal, me estimulan a trabajar cada día más y mejor.

A todos aquellos que han despertado mi vocación médica e investigadora, especialmente a Juan Carlos Leza, Ignacio Lizasoain, Ana Ferreiro, Paula Coutinho y Antonio Guimarães.

A los pacientes y sus familias, por su inmensa generosidad. Sin ellos este proyecto no se hubiera podido realizar. Ellos son el motor que nos impulsa a continuar buscando.

Por último, a mi familia: a mi marido, que me ha estimulado siempre a continuar con el trabajo y ha sacrificado parte de su tiempo libre para que llegase a buen puerto. A mi hermana por su constante apoyo. A mi padre por su presencia silenciosa. A mi familia política por su apoyo “logístico”.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

al.: altri.

APP: Proteína precursora de amiloide.

ARN: Ácido ribonucleico.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

BO: Bulbo olfatorio.

BOLD-fRM: Resonancia magnética funcional dependiente del nivel de oxigenación.

BrdU: Bromodeoxiuridina.

CA1: Área 1 del hipocampo (*Cornus ammonis*)

CA3: Área 3 del hipocampo (*Cornus ammonis*).

cel.: Células.

C9ORF72: Cromosoma 9 marco de lectura abierto 72 (*chromosome 9 open reading frame 72*)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DCX: Doblecortina.

DE: Desviación estándar.

DFT: Demencia frontotemporal.

dgco: Diagnóstico.

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica.

FUS: Traslocado en el sarcoma (*Fused in sarcoma*).

FTD: Demencia frontotemporal.

g: gramos.

GABA: Ácido gamma amino butírico.

GAC: Guanina-Adenosina-Citosina

GD: Giro dentado.

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida.

GSK3B: Quinasa glucogenosintetasa 3 beta.

hab.: Habitantes.

KLH: *Keyhole limpet* homicianina.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LIF: Factor inhibidor de la leucemia derivado de la microglía.

LRKK2: Cinasa de repetición rica en leucina 2.

mM: Milimol.

MPTP: 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina.

NeuN: Proteína nuclear neuronal específica.

NPC: Célula neural pluripotencial.

PBS: Tampón de fosfato salino.

PCNA: Antígeno nuclear de la célula proliferante.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PHOS-H3: Fosfohistona-3.

POMC: Proopiomelanocortina.

Prox1: *Prospero homeobox 1*

PSA-NCAM: Molécula de adhesión a la célula neuronal poliasilada.

PSEN: Presenilina.

RM: Resonancia magnética.

SGZ: Zona subgranular.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPECT: Tomografía por emisión de protón único.

SVZ: Zona subventricular.

TAC: Tomografía axial computerizada.

TARDBP: Gen de la proteína de unión al TAR.

TDP: Proteína transactiva de respuesta de unión al ADN.

TNF: Factor necrótico tumoral.

Tuj1: Beta tubulina neurona específica de clase III.

µm: micras.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

vs.: versus.

Índice de tablas

Tabla 1: Resumen de las alteraciones de la neurogénesis en las enfermedades neurodegenerativas	59
Tabla 2: Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico.....	84
Tabla 3: Resumen de las características clínicas de los pacientes.....	89
Tabla 4: Resumen de las alteraciones cognitivas de los pacientes.....	93
Tabla 5: Resumen de las alteraciones neuropatológicas de pacientes y controles.....	96
Tabla 6: Resumen de los resultados de la neurogénesis en la SVZ.....	122
Tabla 7: Resumen de los resultados de la neurogénesis en el giro dentado.....	141
Tabla 8: Neurogénesis en los modelos experimentales de ELA	151
Tablas en anexo:	
Tabla 9: Resultados de inmunohistoquímica en los pacientes y controles.....	225
Tabla 10: Descripción de los hallazgos de la neurogénesis en la SVZ paciente a paciente.....	227
Tabla 11: Hallazgos de la neurogénesis en el hipocampo paciente a paciente.....	241

Índice de gráficos

•Gráfico 1: Inclusiones de ubiquitina en pacientes y controles.....	99
•Gráfico 2: Inclusiones de TDP-43 total en pacientes y controles.....	99
•Gráfico 3: Porcentaje de inclusiones TDP-43 fosforiladas en el citoplasma de pacientes y controles.....	100
•Gráfico 4: Porcentaje de inclusiones TDP-43 fosforiladas citoplasmáticas en los pacientes según su tratamiento.....	100
•Gráfico 5: Tamaño de la capa hipocelular (GAP) en los pacientes y controles.....	102
•Gráfico 6: Tamaño de la capa hipocelular (GAP) según el tratamiento recibido.....	102
•Gráfico 7: Tamaño de la capa astrocitaria (ribbon) en los pacientes y controles.....	103
•Gráfico 8: Tamaño de la capa astrocitaria (ribbon) en los pacientes y controles.....	103
•Gráfico 9: Número de células GFAP positivas en la SVZ de pacientes y controles	106
•Gráfico 10: Número de células marcadas con GFAP en la SVZ de los pacientes según el tratamiento recibido.....	107
•Gráfico 11: Número de células tipo B marcadas con PCNA en la SVZ en pacientes y controles.....	107
•Gráfico 12: Número de células tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de los pacientes según tratamiento recibido.....	108
•Gráfico 13: Número de células tipo B marcadas con Ki-67 en la SVZ de pacientes y controles.	108
•Gráfico 14: Número de células tipo B marcadas con Ki-67 en la SVZ de pacientes según tratamiento recibido.....	109
•Gráfico 15: Número de células tipo B marcadas con fosfohistona-3 en la SVZ de pacientes y controles.....	109

•Gráfico 16: Número de células tipo B marcadas con fosfohistona-3 en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido.	110
•Gráfico 17: Número de células neurales pluripotenciales marcadas con GFAP δ en pacientes y controles.....	115
•Gráfico 18: Número de células neurales pluripotenciales marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido.....	116
•Gráfico 19: Número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de pacientes y controles.....	118
•Gráfico 20: Número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido.....	118
•Gráfico 21: Número de neuroblastos marcados con doblecortina en la SVZ de controles y pacientes.....	119
•Gráfico 22: Número de neuroblastos marcados con doblecortina en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido	119
•Gráfico 23: Correlación entre el tamaño de la capa GAP y el porcentaje de TDP 43 fosforilada en el citoplasma.....	123
•Gráfico 24: Correlación entre las células GFAP positivas de la SVZ y el porcentaje de TDP-43 fosforilada en el citoplasma.....	124
•Gráfico 25: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células B de la SVZ marcadas con PCNA.....	124
•Gráfico 26: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células B de la SVZ marcadas con Ki67.....	125
•Gráfico 27: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y fosforilada y la cantidad de células neurales pluripotenciales marcadas con GFAP δ en la SVZ.....	125
•Gráfico 28: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos en la SVZ marcados con PSA-NCAM.....	126

•Gráfico 29: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos de la SVZ marcados con DCX.....	126
•Gráfico 30: Estudio de las células marcadas con GFAP en la zona subgranular del hipocampo en pacientes y controles.....	128
•Gráfico 31: Número de células marcadas con GFAP en pacientes según el tratamiento recibido.....	128
•Gráfico 32: Microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes y controles.....	129
•Gráfico 33: Microglía marcada con el marcador IBA-1 en la SGZ de los pacientes conforme al tratamiento recibido.....	130
•Gráfico 34: Células neurales progenitoras proliferativas (tipo 1, tipo A) marcadas con PCNA en la zona subgranular del giro dentado de controles y pacientes.....	132
•Gráfico 35: Células neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con PCNA en la SGZ de los pacientes según el tratamiento recibido.....	132
•Gráfico 36: Células madre neurales progenitoras proliferativas (tipo 1/tipo A) marcadas con Ki67 en la SGZ del giro dentado de pacientes y controles.....	133
•Gráfico 37: Células madre neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con Ki67 en la SGZ de pacientes según su tratamiento.....	133
•Gráfico 38: Células madre neurales progenitoras proliferativas (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona-3 en la SGZ del giro dentado de controles y pacientes.....	134
•Gráfico 39: Células madre neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con fosfohistona 3 en la SGZ del giro dentado de pacientes según el tratamiento recibido.....	134
•Gráfico 40: Estudio de las NPCs (células tipo 2/tipo D1) en la SGZ de pacientes y controles.....	136
•Gráfico 41: Estudio de las NPCs (células tipo 2/tipo D1) en la SGZ de pacientes según el tratamiento recibido.....	136

•Gráfico 42: Neuroblastos (células tipo 3/ D3) marcados con PSA-NCAM en la zona subgranular de pacientes y controles.....	139
•Gráfico 43: Neuroblastos (células tipo 3/tipoD3) en la zona subgranular de pacientes según su tratamiento.....	139
•Gráfico 44: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y citoplasmática y las células marcadas con GFAP en la SGZ del giro dentado.....	142
•Gráfico 45: Correlación entre la cantidad de microglía y el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática de la SGZ.....	143
•Gráfico 46: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada en el citoplasma y las células tipo 1/tipo A marcadas con PCNA en la SGZ.....	143
•Gráfico 47: Correlación entre el número de células tipo 1/tipo A marcadas con Ki67 en la SGZ del giro dentado y el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática.....	144
•Gráfico 48: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células tipo 1/tipo A marcadas con fosfohistona 3.....	144
•Gráfico 49: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de NPCs (células tipo 2/tipo D1) de la SGZ del hipocampo.....	145
•Gráfico 50: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos (células tipo 3/tipo D3) marcadas con PSA-NCAM.....	145

Gráficos en anexo

•Gráfico 51: Peso de los cerebros en controles y pacientes.....	226
•Gráfico 52: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a su sexo.....	228
•Gráfico 53: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a la forma de inicio.....	228
•Gráfico 54: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.....	229

•Gráfico 55: Tamaño de la capa ribbon en pacientes con respecto a su sexo.....	229
•Gráfico 56: Tamaño de la capa ribbon con respecto a la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.....	230
•Gráfico 57: Tamaño de la capa ribbon de los pacientes con respecto a la forma de inicio.....	230
•Gráfico 58: Número de células madre neurales progenitoras proliferativas tipo B de los pacientes según su sexo.....	231
•Gráfico 59: Número de células madre neurales progenitoras proliferativas tipo B marcadas con PCNA según el sexo de los pacientes.....	231
•Gráfico 60: Número de células madre neurales progenitoras tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de los pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.....	232
•Gráfico 61: Número de células madre neurales progenitoras tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de los pacientes según su forma de inicio.....	232
•Gráfico 62: Número de células madre progenitoras tipo B marcadas con Ki67 en la SVZ de los pacientes según su sexo.....	233
•Gráfico 63: Número de células madre progenitoras tipo B marcadas con Ki67 en la SVZ de los pacientes según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.....	233
•Gráfico 64: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con Ki67 en la SVZ de los pacientes según la forma de inicio.....	234
•Gráfico 65: Número de células madre neurales progenitoras tipo B marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.....	234
•Gráfico 66: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes según la forma de inicio de la enfermedad.....	235

•Gráfico 67: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes según sexo.....	235
•Gráfico 68: Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas.....	236
•Gráfico 69: Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según forma de inicio.....	236
•Gráfico 70: Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según sexo.....	237
•Gráfico 71: Número de neuroblastos marcados con PSA NCAM en la SVZ de pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.	237
•Gráfico 72: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes con forma de inicio bulbar y espinal.....	238
•Gráfico 73: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes según sexo.....	238
•Gráfico 74: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas.....	239
•Gráfico 75: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según su forma de inicio.....	239
•Gráfico 76: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según sexo.....	240
•Gráfico 77: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas.....	242
•Gráfico 78: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según la forma de inicio.....	242

•Gráfico 79: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según el sexo.....	243
•Gráfico 80: Cantidad de microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas.....	243
•Gráfico 81: Cantidad de microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes según la forma de inicio.....	244
•Gráfico 82: Cantidad de microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes según sexo.....	244
•Gráfico 83: Cantidad de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con PCNA en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.....	245
•Gráfico 84: Número de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con PCNA en la SGZ de pacientes según la forma de inicio.....	245
•Gráfico 85: Número de células madre neurales tipo 1 /tipo A marcadas con Ki67 según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.....	246
•Gráfico 86: Número de células madre neurales tipo 1 /tipo A marcadas con Ki67 según la forma de inicio.....	246
•Gráfico 87: Número de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona 3 en la zona subgranular de los pacientes según el sexo.....	247
•Gráfico 88: Número de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona 3 en la zona subgranular de los pacientes según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.....	247
•Gráfico 89: Número de células madre neurales progenitoras tipo 1/tipo A en la SGZ de pacientes según la forma de inicio.....	248
•Gráfico 90: Número de NPCs marcadas con GFAP δ en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.....	248

•Gráfico 91: Número de NPCs marcadas con GFAP δ en la SGZ de pacientes con ELA según su forma de inicio.....	249
•Gráfico 92: Número de NPCs marcadas con GFAP δ en la SGZ de pacientes con ELA según sexo.....	249
•Gráfico 93: Números de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en el hipocampo de pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.....	250
•Gráfico 94: Números de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en el hipocampo de pacientes según su forma de inicio.....	250
Gráfico 95: Neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SGZ de los pacientes según su sexo.....	251

Índice de imágenes

• Imagen 1 : Neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado.....	33
• Imagen 2: Neurogénesis en la zona subventricular en el humano.....	42
• Imagen 3: Posible función de la neurogénesis en la SVZ en condiciones fisiológicas y patológicas.....	48
• Imagen 4: Clínica de la esclerosis lateral amiotrófica.....	62
• Imagen 5: Etiopatogenia de la ELA.....	64
• Imagen 6: Anticuerpos en las distintas fases celulares de la neurogénesis en la SVZ.....	81
• Imagen 7: Un mismo anticuerpo puede marcar más de una fase celular en la neurogénesis.....	82
• Imagen 8: Estructura de la SVZ en la ELA y el control.....	104
• Imagen 9: Las células que marcan para GFAP lo hacen también para Ki67 en la SVZ.....	111
• Imagen 10: Las células que marcan para GFAP lo hacen también para fosfohistona 3 en la SVZ.....	111
• Imagen 11: Aumento de las células madre neurales en la SVZ de los pacientes con ELA y con ELA con DFT frente a controles.....	112
• Imagen 12: Proliferación de las células madre neurales tipo B en la SVZ de los pacientes con ELA.....	113
• Imagen 13: En la SVZ de los pacientes con ELA se observan células madre marcadas para fosfohistona 3.....	113
• Imagen 14: En la SVZ los pacientes con ELA y demencia frontotemporal existen numerosos astrocitos que emiten una prolongación hacia el ventrículo.....	114
• Imagen 15: El incremento de la neurogénesis en la SVZ de los pacientes con ELA afecta también a la fase de neuroblastos.....	120
• Imagen 16: Neuroblastos en un paciente con ELA.....	120

• Imagen 17: El número de neuroblastos marcados con doblecortina aumenta en la SVZ de los pacientes con ELA y DFT.....	121
• Imagen 18: La SGZ de los pacientes con ELA presenta una importante reducción de NPCs.....	137
• Imagen 19: En la SGZ de los pacientes con ELA existe una importante reducción de neuroblastos.....	140
• Imagen 20: Aspecto del nicho medular en uno de los pacientes del estudio.....	155
• Imagen 21: Modificaciones de la neurogénesis en la SVZ en los pacientes con ELA.....	163
• Imagen 22: Esquema de los cambios encontrados en la neurogenesis en la zona subgranular.....	164
• Imagen 23: Comparativa de la SVZ en las enfermedades neurodegenerativas en humanos.	174

Imágenes en anexo:

• Imagen 24: RM del paciente 2.....	221
• Imagen 25: RM del paciente 2.....	221
• Imagen 26: TAC de la paciente 7.....	222
• Imagen 27: RM del paciente 8.....	222
• Imagen 28: RM del paciente 5.....	223
• Imagen 29: Sección medular en la necropsia.....	223
• Imagen 30: Inclusiones ubiquitinadas en paciente con ELA.....	224

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. SUMMARY.....	14
III.INTRODUCCIÓN.....	25
III.a. Concepto de neurogénesis del adulto.....	28
III.b. Neurogénesis adulta en el hipocampo.....	31
III.b.1. La fase de células precursoras.....	34
III.b.2. Fase de la supervivencia precoz.....	34
III.b.3. Fase de la maduración postmitótica.....	35
III.b.4. Fase de maduración tardía.....	35
III.c. Neurogénesis adulta en la zona subventricular y bulbo olfatorio.....	37
III.c.1. El nicho neurogénico SVZ.....	37
III.c.1.a. Composición celular del nicho neurogénico.....	38
III. d. Otros potenciales nichos neurogénicos.....	43
III.d.1. Nicho medular periventricular.....	43
III.d.1.a. El nicho neurogénico medular central en el humano.....	44
III.d.2. Sustancia nigra.....	45
III. e. Significado funcional de la neurogénesis.....	46
III.e.1. Significado funcional de la neurogénesis en el bulbo olfatorio/SVZ.....	47

III.e.2 Neurogénesis y sistema de memoria hipocampal.....	48
III. f. Estudio de la neurogénesis in vivo.....	51
III.g. Neurogénesis y enfermedades neurodegenerativas.....	52
III. g. 1. Neurogénesis adulta y enfermedad de Parkinson.....	52
III.g.1.a. Estudios en humanos.....	53
I. g. 1. b. Estudios en modelos animales.....	53
III.g.2. Neurogénesis y enfermedad de Alzheimer.....	54
III. g. 2. a. Estudios en el humano.....	54
III. g 2. b. Neurogénesis en los modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer.....	55
III. g. 3. Neurogénesis en el adulto y enfermedad de Huntington.....	56
III. g. 3. a. Neurogénesis en la enfermedad de Huntington, estudios en el humano.....	56
III. g. 3. b. Neurogénesis en la enfermedad de Huntington, estudios en el modelo animal.....	57
III. h. La esclerosis lateral amiotrófica.....	60
III. h. 1. Conceptos generales.....	60
III. h. 2. Patología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	62
III. h. 3. Etiopatogenia.....	63
III. h. 4. Modelos experimentales en la ELA.....	65
III. h. 5. Tratamiento.....	66

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	69
V. HIPÓTESIS.....	72
VI. OBJETIVOS.....	74
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
VII. a. Pacientes.....	77
VII. b. Cuestiones éticas.....	78
VII. c. Estudio histológico.....	78
VII. c. 1. Necropsias.....	78
VII. c. 2. Estudio inmunohistoquímico.....	80
VII. c. 2. a. Inmunofluorescencia.....	81
VII. c. 3. Microscopía electrónica.....	83
VII. d. Análisis estadístico.....	85
VIII. RESULTADOS.....	86
VIII. a. Descripción de las variables clínicas en los	
pacientes.....	87
VIII. a. 1. Forma de inicio de la enfermedad.....	87
VIII. a. 2. Edad de inicio de la clínica.....	87
VIII. a. 3. Sexo de los pacientes y controles.....	88
VIII. a. 4. Tiempo desde el inicio al diagnóstico.....	88
VIII. a. 5. Edad en momento de fallecimiento de pacientes y	
controles.....	88
VIII. a. 6. Supervivencia desde el inicio de los síntomas.....	88
VIII. a. 7. Supervivencia desde el diagnóstico.....	90
VIII. a. 8. Historia familiar.....	90
VIII. a. 9. Estudio genético de los pacientes	90

VIII.a.10. Deterioro cognitivo.....	91
VIII. a. 11. Pruebas de neuroimagen.....	93
VIII. a. 12. Uso de ventilación mecánica no invasiva.....	94
VIII. a. 13. Condiciones asociadas.....	94
VIII. a. 14. Enfermedades neurológicas asociadas en los controles.....	95
VIII. a.15. Tratamiento etiopatogénico con riluzol.....	95
VIII. b. Resultados neuropatología.....	96
VIII. c. Resultados del estudio de la neurogénesis.....	101
VIII. c. 1. Estudio de la neurogénesis en la zona subventricular.....	101
VIII. c. 1. a. Modificación del nicho neurogénico.....	101
VIII. c. 1. b Estudio de la proliferación de las células neurales progenitoras proliferativas (tipo B).....	104
VIII. c. 1. c. Estudio de las células neurales pluripotenciales, tipo C.....	114
VIII. c. 1. d. Estudio de la neurogénesis en la SVZ: Fase de neuroblastos, células A.....	116
VIII. c. 1. e. Estudio de la correlación de la neurogénesis con otras variables.....	122
VIII. c. 2. Estudio de la neurogénesis en el hipocampo.....	127
VI. c. 2. a. Cambios de la estructura del nicho de la zona subgranular del giro dentado	127
<i>VI. c. 2. a. 1. Cambios de la composición celular de la zona subgranular del giro dentado.....</i>	127
VIII. c. 2. b. Estudio de la proliferación celular, células pluripotenciales, células 1, tipo A.....	130
VIII. c. 2. c. Estudio de la proliferación de las células neurales pluripotenciales (NPCs, células tipo 2, células tipo D1).....	135
VIII. c. 2. d. Estudio de la proliferación de los neuroblastos en la zona subgranular del giro dentado (células tipo 3, D3).....	138
VIII. c. 2. e. Estudio de la correlación de la neurogénesis en hipocampo con otras variables.....	141

VIII. d. Estudio de la neurogénesis por microscopía electrónica.....	146
VIII. e. Resumen de resultados.....	146
IX. DISCUSIÓN.....	148
IX.a.Esclerosis lateral amiotrófica y Neurogénesis.....	149
IX.a.1. Neurogénesis en los modelos experimentales de ELA.....	150
IX.a.2 Neurogénesis y tratamiento de la ELA.....	152
IX.a.3. Neurogénesis adulta en la ELA en el humano.....	154
IX. b. Los nichos neurogénicos clásicos responden de forma diferente en la esclerosis lateral amiotrófica.....	156
IX. c. La estructura de los nichos neurogénicos se modifica en la ELA.....	160
IX. d. La modificación de la neurogénesis en los pacientes con ELA afecta a todas las líneas celulares, desde las células pluripotenciales hasta los neuroblastos.....	165
IX.e. La presencia de demencia frontotemporal hace que la respuesta del nicho neurogénico sea mayor.....	167
IX. f. La modificación de la neurogénesis no varía de forma significativa cuando se consideran las otras características de la muestra.....	170
IX. g. ¿Es el patrón de modificación de la neurogénesis en la ELA específico de la misma?.....	173
IX. h. El porcentaje de TDP-43 fosforilada se correlaciona con las alteraciones de la neurogénesis.....	176
IX. i. En algunos de los pacientes se observa depósito de amiloide en hipocampo.....	179

IX. j. La muestra de pacientes que ceden tejidos para investigación tiene unas características especiales.....	181
IX. k. Un 77% de los pacientes de nuestra serie presentan atrofia en la neuroimagen.....	182
IX. l. Los síntomas neuropsiquiátricos son frecuentes en pacientes con ELA.....	183
IX. m. ¿Podría ser la estimulación de la neurogénesis adulta intrínseca una potencial vía terapéutica en la ELA?.....	184
IX. n. Limitaciones del estudio.....	186
X. CONCLUSIONES.....	189
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	193
XII. ANEXOS.....	219
XII. a. Material suplementario.....	220
XII. b. Artículos.....	252

I. RESUMEN

ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN NECROPSIAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

1. Introducción.

Ramón y Cajal introdujo el concepto de que la carga de neuronas del sistema nervioso central se mantiene inmutable tras el nacimiento (Ramon y Cajal 1928) y esta idea se consideró uno de los axiomas de las neurociencias hasta nuestros días. La posibilidad de que la neurogénesis se mantuviera en la edad adulta se apuntó por primera vez en estudios realizados en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo de pájaros (Nottebohm 1989) y precisó de tiempo y numerosos estudios hasta que se aceptó en el total de los mamíferos y en el humano (Altman 1962, Yuan *et al.* 2014).

Existen dos nichos neurogénicos claramente establecidos y conservados a lo largo de las especies a los que se llama nichos neurogénicos clásicos: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado. La zona subventricular se encuentra adyacente al ventrículo lateral y está formada por tres capas: la capa endimaria, la capa hipocelular o *GAP* y la capa astrocitaria o *ribbon*. La neurogénesis en la SVZ pasa por una serie de fases celulares partiendo de las células neurales progenitoras proliferativas que se encuentran en una fase de división y proliferación y que tienen marcadores gliales (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009), células tipo B, a las células neurales progenitoras que todavía mantienen alguna característica glial pero ya presentan alguna diferenciación neuronal (células tipo C) a los neuroblastos (tipo A). Posteriormente algunas de esas células mueren y esta fase de supervivencia probablemente es fundamental para la regulación de la propia neurogénesis (Ribeiro Xavier *et al.* 2015), las células que sobreviven migran y, en el caso de la mayor parte de los mamíferos lo hacen siguiendo un camino migratorio rostral hasta el bulbo olfatorio (Liu y Rao 2003), la existencia de este camino migratorio en el humano está muy

discutida (Curtis *et al.* 2007c). La tasa de proliferación de la SVZ es mucho mayor que la de la SGZ del giro dentado y la cantidad de células formadas también es mayor.

El segundo nicho es la zona subgranular del giro dentado. En este nicho las células madre neurales también provienen de los astrocitos y pasan de nuevo fundamentalmente por tres estadios: las células madre neurales progenitoras proliferativas, tipo 1 o tipo A, las células neurales pluripotenciales, tipo 2 o tipo D1 y los neuroblastos tipo 3 o tipo D3. En este caso las células igualmente pasan por una fase de muerte y supervivencia y posteriormente se integran como neuronas granulares del giro dentado (es decir no tienen una migración importante).

La propia estructura de los nichos es fundamental para la neurogénesis. Si sacamos las células neurales proliferativas de los nichos y las colocamos en otras zonas del sistema nervioso no dan lugar a neuronas sino simplemente a glia y si las sacamos de la SVZ y las colocamos en la SGZ el giro dentado, dan lugar a neuronas pero a neuronas granulares (Garzon-Muvdi y Quinones-Hinojosa 2009). Es decir los nichos no son sólo el lugar donde ocurre la neurogénesis sino que participan de forma directa en la misma.

Se han descrito otras zonas que actúan como nichos neurogénicos. Las más aceptadas son el nicho central medular y la sustancia negra (Garcia-Ovejero *et al.* 2015, Shan *et al.* 2006). La estructura de estos nichos neurogénicos está peor establecida y a diferencia de los nichos neurogénicos clásicos probablemente sólo se activan en situaciones patológicas.

La función exacta de los nichos neurogénicos clásicos se desconoce, en el caso de la SVZ en situación fisiológica tiene que ver con el olfato, al menos en los animales (Lazarini y Lledo 2011), pero a partir de estudios realizados fundamentalmente en el ictus se encontró que la SVZ aumenta su proliferación en condiciones patológicas de manera que los neuroblastos migran hasta la zona dañada y los que sobreviven se integran en ella (Marti-Fabregas *et al.* 2010). Esto ha hecho que se considere que la SVZ pueda tener una función restauradora en situaciones patológicas.

En el caso de la SGZ del giro dentado no se ha descrito esta potencial función restauradora. Basandose en los estudios realizados en aves y mamíferos la neurogénesis a ese nivel parece tener un papel en varios procesos de la memoria (fundamentalmente de la memoria de consolidación) (Kempermann *et al.* 2015).

En las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington) se ha descrito la presencia de síntomas asociados a la neurogénesis (alteraciones del olfato, síntomas neuropsiquiátricos) de forma frecuente y anterior a la aparición de los síntomas característicos de cada una de ellas (memoria, olfato, etc.) (Winner y Winkler 2015), por lo que algunos autores consideran que la alteración de la neurogénesis en estas enfermedades pueda ser un factor primario de ellas y que forme parte de su fisiopatogenia. Por otro lado, aunque la mayor parte de los estudios describen una reducción de la neurogénesis en estas entidades, los trabajos realizados arrojan resultados diferentes según se realice el estudio en necropsias o en modelos animales, y según el nicho analizado. Además existen pocos estudios que examinen ambos nichos neurogénicos al mismo tiempo, lo que hace que la interpretación sea mas difícil. En cualquier caso, en el humano se ha descrito una reducción de la neurogénesis en la SGZ para todas las patologías neurodegenerativas con excepción de la enfermedad de Alzheimer en la que podría existir un aumento inicial y una reducción posterior y la enfermedad de Huntington en que no parece modificarse la neurogénesis (Low *et al.* 2011, Bossers *et al.* 2010). Cuando se analiza la zona subventricular se describe una reducción también para todas las enfermedades neurodegenerativas con respecto a los controles con excepción de la enfermedad de Huntington en la que parece existir un incremento de la proliferación (Curtis *et al.* 2007a).

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva de etiopatogenia desconocida y sin tratamiento curativo en el momento actual (Mitchell y Borasio 2007). Su marcador histológico es la presencia de cuerpos de Bunina que corresponden a inclusiones con ubiquitina y con TDP-43 fosforilada y citoplasmática. Estas inclusiones parecen estar presentes en todos los casos de ELA esporádica y en muchas de las formas familiares (Mackenzie *et al.* 2007). Aunque inicialmente se consideraba una enfermedad exclusiva de las neuronas motoras se ha comprobado que

afecta a otras células y funciones del sistema nervioso (Boillee *et al.* 2006). En este sentido las alteraciones cognitivas y de la inteligencia social son frecuentes en la enfermedad y de forma menos frecuente (aproximadamente en un 10% de los casos) puede aparecer demencia (Beeldman *et al.* 2015). Se han descrito ocasionalmente alteraciones del olfato que están presentes en la ELA asociada a parkinsonismo y demencia de la isla de Guam (Ahlskog *et al.* 1998) y menos frecuentemente en la ELA esporádica en la que parece asociarse a la presencia de TDP-43 y a una mayor tendencia a la aparición de alteraciones cognitivas (Takeda *et al.* 2014).

Por todo ello cabe considerar que en la ELA como enfermedad neurodegenerativa podría encontrarse una alteración de la neurogénesis.

2. Objetivos

1. Describir el estado de la neurogénesis del adulto en necropsias procedentes de pacientes con ELA para verificar nuestra hipótesis, analizando para ello ambos nichos: subventricular y SGZ del giro dentado.
2. Si hay una modificación en la neurogénesis, determinar en que estadio o estadios se produce para cada uno de los nichos neurogénicos, y si afecta o no a la estructura de los nichos.
3. Si hay una modificación en la neurogénesis, determinar si existe una correlación el fenotipo de los pacientes (incluyendo clínica y neuroimagen) con la alteración de la misma.

3. Material y métodos

Nueve pacientes con ELA (todos procedentes de nuestro centro), dos de ellos con demencia frontotemporal asociada o sus familias cedieron su encéfalo para la realización del estudio. Cuatro familias de pacientes controles, sin patología neurodegenerativa, también procedentes de nuestro cedieron también cerebro para el estudio.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes para recoger las variables relacionadas con la enfermedad (edad de inicio, sexo, tiempo hasta el diagnóstico, tiempo hasta la muerte, forma de inicio, patologías asociadas, características de neuroimagen, presencia de síntomas neuropsiquiátricos y estudios genéticos asociados). Se revisaron las historias de los controles para verificar que no existía patología neurodegenerativa.

Igualmente se practicó un estudio de las necropsias de los pacientes y controles tanto desde el punto de vista macroscópico como microscópico. Se llevó a cabo también el estudio inmunohistoquímico de los marcadores de la enfermedad ubiquitina y TDP-43 total y citoplasmática.

Por último se estudió la neurogénesis centrándonos en los dos nichos clásicos SVZ y SGZ del giro dentado. Para ello se utilizaron marcadores de proliferación y gliosis para la fase de células neurales progenitoras proliferativas (GFAP, PCNA, Ki67 y PHOS-H3), para la segunda fase, fase de células neurales pluripotenciales se utilizó el GFAP δ y para la fase de neuroblastos los marcadores PSA-NCAM, DCX y Tuj-1.

Se realizó un análisis visual y cuantitativo de los estudios inmunohistoquímicos. Para el análisis estadísticos dado el pequeño tamaño de la muestra se utilizaron test no paramétricos (U de Mann-Whitney y regresión de Pearson).

4. Resultados

4.a. Resultados del análisis clínico

Encontramos que nuestra muestra es una muestra extrema en cuanto a la gravedad de la enfermedad, con baja supervivencia (desde el inicio de los síntomas de 24,88 meses y desde el diagnóstico de 12,44 meses). Esto se correlaciona con una alta frecuencia de formas de inicio bulbar con un 55% de los pacientes con esta forma de inicio. Dos de los pacientes asociaban demencia frontotemporal, pero un 55% presentaban síntomas neuropsiquiátricos. En nuestra serie no hay formas familiares ni juveniles.

Las pruebas de neuroimagen mostraban en más del 70% de los casos atrofia de predominio frontal y temporal.

4.b. Resultados de la neuropatología

Todos los pacientes cumplían criterios neuropatológicos de ELA. Desde el punto de vista neuropatológico el hallazgo más prominente era la atrofia de las astas anteriores. Cuando se analizan las inclusiones TDP-43 fosforiladas en el citoplasma el análisis visual tiene tendencia a subestimarlas, al hacer un análisis cuantitativo de las mismas se observa que existe un aumento estadísticamente significativo de las mismas en los pacientes con ELA, que es mayor en aquellos pacientes con demencia frontotemporal asociada y en los que no reciben riluzol, en este último caso la diferencia es significativa.

En el análisis visual no cuantitativo se observó que dos de los pacientes, una con demencia frontotemporal y otro sin alteraciones cognitivas presentaban depósito de amiloide en el hipocampo.

4. c. Resultados de la neurogénesis

4. c. 1. Zona subventricular

En la zona subventricular encontramos que se modifica la estructura del nicho de forma que en los pacientes con ELA se produce un aumento del tamaño de la capa GAP (hipocelular) y la capa *ribbon* astrocitaria. El tamaño de ambas capas es prácticamente el doble que el de los controles. Estas diferencias son significativas con respecto a los controles.

Igualmente existe un aumento de la proliferación de todas las células progenitoras de la SVZ desde la fase más precoz (células tipo B) hasta los neuroblastos, es decir existe un aumento de la proliferación con una diferenciación neuronal, este incremento es mayor en los casos que asocian demencia frontotemporal (aunque dado que solo dos casos asociaban demencia frontotemporal no se puede realizar un estudio estadístico). En el caso de las células neurales progenitoras proliferativas (tipo B) existe un aumento que es significativo para todos los marcadores GFAP, Ki67 y PCNA, con excepción de la fosfohistona-3 en que existe un aumento pero que no es significativo estadísticamente. En el caso de este tipo de células el incremento en los pacientes de ELA oscila entre dos veces más células a tres veces más, según el marcador utilizado. Con respecto a la GFAP observamos que este marcador está presente en las mismas células que expresan los otros marcadores de proliferación, es decir, que estas células aunque de características gliales corresponden a verdadera células madre neurales progenitoras.

Para marcar el segundo nivel de células, las células tipo C, NPCs se utilizó el marcador GFAP δ , de nuevo se observa un aumento de la proliferación que es estadísticamente significativo en los pacientes con ELA. En estos pacientes encontramos aproximadamente el triple de células NPCs.

En el caso de los neuroblastos se utilizaron los marcadores PSA-NCAM, Doblecortina y Tuj-1 en todos ellos se observaba un aumento del marcaje, aunque éste fue imposible de cuantificar en el Tuj-1 porque se localizaba en las prolongaciones y no en los

cuerpos neuronales. Para los otros casos se observaba un aumento (aproximadamente tres veces más) del número de neuroblastos en los pacientes con ELA. Esta diferencia era estadísticamente significativa.

No existían diferencias cuando se analizaban los pacientes considerando si recibían o no tratamiento con riluzol, la forma de inicio de la enfermedad, la presencia de alteraciones de neuropsiquiátricas.

Se realizó un estudio de regresión en el que no se encontró una correlación con la edad de los pacientes ni con la TDP-43 total, pero sí existía una correlación directa, lineal y estadísticamente significativa entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el aumento de la neurogénesis en todas las fases celulares desde las células progenitoras hasta los neuroblastos.

4. c. 2. Neurogénesis en la zona subgranular del hipocampo

En la zona subgranular del hipocampo no se observa una modificación del tamaño de la capa subgranular de los pacientes con ELA con respecto a los controles. En el caso de esta zona encontramos un aumento de la GFAP (cuatro veces más que los controles) pero que no colocaliza con otros marcadores de proliferación, es decir que parece corresponder a una auténtica gliosis. Por otro lado la microglía se encuentra reducida en cantidad (aproximadamente la mitad de células que los controles) pero con una morfología ameboide que indica que la microglía está activada.

En lo que se refiere a la neurogénesis encontramos una reducción de todas las fases de proliferación de la misma. Desde las más precoces células neurales progenitoras proliferativas, tipo 1, tipo A, pasando por las intermedias NPCs, tipo 2, D1 hasta los neuroblastos tipo 3, D3. Es decir se encuentra una marcada reducción de todas las células neurales pluripotenciales, en el caso de los pacientes que asocian demencia frontotemporal dependiendo del marcador incluso no se encuentra ninguna célula madre en la zona subgranular.

Para analizar la primera fase, células neurales progenitoras proliferativas, tipo 1, tipo A, se utilizaron los marcadores PCNA, Ki67 y PHOS-H3 en todos ellos se encuentra una reducción significativa de estas células en los pacientes con ELA con respecto a los controles (presenta aproximadamente 5 veces menos).

El segundo estadio celular, el de las células neurales pluripotenciales (NPCs), tipo 2, tipo D1 se analizó utilizando el marcador GFAP δ . En este caso de nuevo se encontró una reducción significativa del número de células en los pacientes con ELA (aproximadamente 5 veces menos que los controles), además estas células tienen una morfología diferente redondeada.

Por último para estudiar el estadio de neuroblastos, células tipo 3, tipo D3, se realizaron las técnicas PSA-NCAM, DCX y Tuj-1 aunque en todas ellas se encontró una marcada reducción del número de neuroblastos marcados en los pacientes con ELA sólo se pudo cuantificar para el PSA-NCAM (con los otros dos marcadores los cuerpos celulares no se teñían). En el caso del PSA-NCAM la reducción era marcada y estadísticamente significativa (unas 15 veces menos en los pacientes con ELA que en los controles).

No se encontraron diferencias significativas cuando se analizaron las diferentes variables clínicas tratamiento o no con riluzol, presencia de síntomas neuropsiquiátricos, forma de inicio o sexo.

En el estudio de correlación no se encontró correlación de la neurogénesis con la edad de los pacientes, ni con la TDP-43 total. Sin embargo existía una correlación con el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática, esta correlación es exponencial e inversa para todas las fases celulares de la neurogénesis. Es decir a mayor TDP-43 fosforilada en el citoplasma menor neurogénesis en la zona subgranular.

5. Discusión

Existen pocos estudios de la situación de la neurogénesis en la esclerosis lateral amiotrófica. El único caso publicado sobre la neurogénesis en pacientes con ELA es uno de los casos analizados en este trabajo (Galan *et al.* 2011). Los otros trabajos encontrados en la literatura se han realizado apenas en el modelo animal transgénico para la *SOD1* (Warita *et al.* 2001, Chi *et al.* 2007, Chi *et al.* 2006, Guan *et al.* 2007). La mayor parte de estas publicaciones se han centrado en el nicho medular central (Guan *et al.* 2007, Warita *et al.* 2001, Chi *et al.* 2006). En este nicho los autores encuentran en el modelo animal un incremento de la proliferación que para algunos es anterior al inicio de la enfermedad y para otros coincide con ella, sin embargo uno de los estudios no encontró dicho incremento sino que la proliferación celular parece derivarse hacia la gliogénesis (Guan *et al.* 2007). El único trabajo realizado en el modelo animal en los nichos clásicos encuentra como en nuestro estudio un aumento de la neurogénesis en la zona subventricular (Chi *et al.* 2007), pero no encontraba ninguna modificación en la SGZ del giro dentado.

Nuestro trabajo encuentra en las necropsias de pacientes con ELA un incremento de la neurogénesis en todas las fases celulares en la SVZ, por tanto, un incremento de la neurogénesis con diferenciación neuronal. Este incremento podría estar relacionado con el papel restaurador que se le ha conferido a este nicho ante agresiones. Llama la atención que a nivel de la SGZ del giro dentado encontramos una reducción muy marcada de todas las fases celulares de la neurogénesis.

Las posibles causas de la diferente respuesta de ambos nichos neurogénicos a la enfermedad tendrá que ser estudiada en trabajos específicos. Podría considerarse como una explicación a este hecho que los factores reguladores sean diferentes en los diferentes nichos, aunque hasta el momento esto no se ha demostrado para los diferentes factores reguladores de ambos nichos neurogénicos. Otra posibilidad sería que el factor que incrementa la neurogénesis en la zona subventricular no sea capaz de llegar al giro dentado. En este sentido podría postularse que dicho factor llegue a través del líquido cefalorraquídeo que está en contacto con la SVZ y no con el GD. A favor de esta

posibilidad se encuentra la presencia de numerosas células madre que emiten una prolongación hacia el ventrículo lateral en los casos de ELA que asocian demencia frontotemporal. Por último, otra posibilidad sería que el incremento de la neurogénesis en la SVZ tenga una verdadera función reparadora mientras que la alteración de la neurogenesis en la SGZ del giro dentado forme parte de la etiopatogenia de la enfermedad y sea por tanto un fenómeno primario de la misma, esto mismo se ha considerado en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas.

Por último, hemos encontrado en nuestro análisis una correlación significativa entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y como se modifica la neurogénesis en cada uno de los nichos. Es decir en la SVZ existe una correlación directa y en la SGZ del GD inversa. Se necesitan estudios específicamente diseñados para valorar si esta relación es causal, si hay un factor común que modifique ambas variables o si, como algunos autores sugieren, la TDP-43 fosforilada se correlaciona con la extensión de la enfermedad (Brettschneider *et al.* 2013).

6. Conclusiones

En las necropsias de esclerosis lateral amiotrófica observamos una alteración de la neurogénesis con respecto a los controles. Esta alteración tiene diferente sentido dependiendo del nicho neurogénico que analicemos: en la zona subventricular se encuentra aumentada y existe una diferenciación neuronal; en la zona subgranular el giro dentado del hipocampo se encuentra reducida.

Hemos observado esta alteración en todas las fases de la neurogénesis, desde la fase de células neurales progenitoras proliferativas -tipo B (SVZ), tipo 1/tipo A (SGZ del giro dentado)- (las células menos diferenciadas), pasando por la fase de células neurales pluripotenciales -tipo C (SVZ) , tipo 2 /tipo D1 (SGZ del giro dentado)- hasta los neuroblastos -células tipo A (SVZ), tipo 3 /tipo D3 (SGZ del giro dentado)-.

Existe además una modificación de las características de la citoarquitectura de ambos nichos neurogénicos.

Estas alteraciones son más intensas en los casos que asociaban a la enfermedad de neurona motora clínica de demencia frontotemporal. No se encuentra asociación con las otras variables clínicas ni de neuroimagen analizadas.

II. SUMMARY

NEUROGENESIS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS NECROPSIES

1. Introduction

The number of neurons in the central nervous system was considered immutable after Ramon y Cajal's works (Ramon y Cajal 1928). The concept of adult neurogenesis was introduced after some studies in the brain of adult birds (Nottebohm 1989), more evidence was needed until this concept was accepted for all mammals and even in humans (Altman 1962, Yuan *et al.* 2014).

Two neurogenic niches are widely accepted: subventricular zone and subgranular zone in *girus dentatus*. These niches are conserved along the evolution of species. Subventricular zone is located near the lateral ventricle. It is formed by three layers: ependymal layer, GAP layer (hypocellular) and ribbon layer (astrocytic). Three types of stem cells are described in the SVZ: neural proliferative progenitor cells (that stain for glial markers) (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009) -type B-, neural pluripotent cells with some glial characteristics but also some neuronal differentiation (type C cells) and neuroblasts (type A cells). Some of these cells die after their formation and this survival phase is probably the most important one in the regulation of neurogenesis (Ribeiro Xavier *et al.* 2015). Those cells that are able to survive migrate and, at least in mammals, take the rostral migratory stream (RMS) to olfactory bulb (Liu y Rao 2003). RMS existence in humans is not accepted for all authors (Curtis *et al.* 2007c). Proliferation rate in SVZ is much more bigger than in SGZ and the number of stem cells in the niche is also bigger. However this fact is discussed in the healthy human.

Subgranular zone is the second classic neurogenic niche. In this niche neural there are also three types of stem cells and they also come of glial cells: neural progenitor proliferative stem cells, type 1 or type A, neural pluripotent cells, type 2 or type D1 and neuroblasts, type 3 or type D3. Again these stem cells have a survival phase and then they integrate as granular neurons.

The niches structure is fundamental for neurogenesis. When we transplant of neural stem cell outside the niche they are no longer able to develop into new neurons, they develop into glia cells and when we take SVZ neural stem cell to *dentatus gyrus*, they develop neurons but granular neurons (Garzon-Muvdi y Quinones-Hinojosa 2009). Niches are not just a place where neurogenesis occur they have a key role in it.

Other neurogenic niches has been described. The most accepted ones are spinal central niche and substance *nigra* (Garcia-Ovejero *et al.* 2015, Shan *et al.* 2006). The structure of this other neurogenic niches is not so well known and they probably are normally quiescent and just activate under pathological conditions.

The exact function of the neurogenic niches is not known yet. SVZ has a role in olfaction under physiological conditions at least in animals (Lazarini y Lledo 2011). After some studies in stroke, proliferation in SVZ has been found to increase under pathological conditions, new neurons in this case migrate to the damaged area and the ones that survive integrate in it (Marti-Fabregas *et al.* 2010). Because of that SVZ has been considered as having a restorative function under pathological conditions.

This restorative function has not been described for dentatus gyrus. Based in the studies in birds and mammals a role in several steps of memory (as consolidation memory) has been elicited for dentatus gyrus (Kempermann *et al.* 2015).

In the case of neurodegenerative diseases (Alzheimer disease, Parkinson disease and Huntington disease) symptoms traditionally associated to neurogenesis (olfaction, neuropsychiatric symptoms) has been described often and usually preceding the classical symptoms of the disease. That is the reason why some authors have the hypothesis that neurogenesis has a primary and crucial role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Winner y Winkler 2015). Although most studies found a reduction of

neurogenesis in these diseases, the studies have different results depending on whether they have been carried on in animals or humans, and on what niche or niches have been studied. In addition to that, few studies have analyzed both neurogenic niches simultaneously, so the interpretation of results is difficult. Reduction of neurogenesis in SGZ has been described in humans for all neurodegenerative diseases with the exception of Alzheimer disease (in which it appears to be an increase of neurogenesis at the beginning of the disease followed by a reduction in it at the terminal stages) and Huntington disease, where neurogenesis in SGZ remains unchanged (Low *et al.* 2011, Bossers *et al.* 2010). In SVZ a reduction of neurogenesis has been found for all neurodegenerative diseases with the exception of Huntington disease where an increase of proliferation has been described (Curtis *et al.* 2007a).

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressive neurodegenerative disease of unknown cause and without cure nowadays (Mitchell y Borasio 2007). Its histological hallmark are Bunina bodies, that colocalize with ubiquitin, phosphorylated cytoplasmic TDP-43 inclusions. These inclusions have been described in all cases of sporadic ALS and in most familial forms (Mackenzie *et al.* 2007). Although initially considered an exclusive disease of motor neurons, ALS affects other cells and functions of nervous system (Boillee *et al.* 2006). Cognitive alterations and social intelligence symptoms are frequent at the disease and in a 10% of cases dementia has been reported (Beeldman *et al.* 2015). Olfaction alteration has been described in ALS associated to parkinsonism and dementia from Guam island (Ahlskog *et al.* 1998) and in some cases of sporadic ALS, in these cases it appears to be associated to the presence of phosphorylated cytoplasmic TDP-43 and also with cognitive alterations (Takeda *et al.* 2014).

As in other neurodegenerative diseases neurogenesis could be altered in ALS.

2. Objectives

1. To describe adult neurogenesis in ALS patients necropsies analyzing both neurogenic niches: subventricular and dentatus gyrus.
2. If a modification in neurogenesis exists, to determinate the stage or stages in wich it happen and if affects the niches structure.
3. If modification in neurogenesis exists, to determinate whether there is a correlation with the patient phenotype (including brain imaging).

3. Matherial and methods

Nine ALS patients (two of them with frontotemporal dementia associated) followed at our center, and/or their families donated their brains for the study. Also four families of patients of our center without neurodegenerative disease (controls) donated their brains for the study.

All clinical histories of patients and controls were reviewed in order to recollect the variable putatively related to the disease in cases (age at the beginning of the disease, gender, time to diagnosis, time to death, type of symptoms at the beginning (bulbar or spinal), neuropsychiatric symptoms and genetic studies and the presence of neurodegenerative disease in controls.

We also performed the necropsies review in patients and controls including macroscopic and microscopic study, and immunohistochemistry study of ubiquitin, total TDP43 and phosphorylated cytoplasmic TDP-43.

Neurogenesis study was performed in the two classical niches (SVZ and SGZ). We used proliferation and glial markers for the neural progenitor proliferative phase (GFAP, PCNA, Ki67 and PHOS-H3), for the second phase neural pluripotential cell we used δ GFAP and for the neuroblasts phase we used PSA-NCAM, DCX and Tuj-1.

A visual and quantitative analysis was performed. For the statistical analyses because of the reduced size of the sample we use non parametric test (Mann Whitney and Pearson).

4. Results

4.a. Clinical results

We found that our sample was extreme regarding the severity of the disease, patients have a very low survival (24,88 months from the beginning of the disease and 12,44 months from the diagnosis). These correlates with a high percentage of bulbar forms (55%). Two patients have frontotemporal dementia but 55% have neuropsychiatric symptoms. We do not have any patient with familial or juvenile ALS.

We found than more of 70% of patients had atrophy in brain image with a predominance of temporal and frontal localization.

4.b. Neuropathological results

All patients met pathological criteria of ALS. From a neuropathological point of view the most remarkable finding was anterior spinal horn atrophy. When we analyzed phosphorylated cytoplasmic TDP-43 inclusions visual analyses tend to underestimate them but when we performed a quantitative analysis we found a significant difference increase in ALS patients compared with controls. This difference is bigger for the ALS patients with frontotemporal dementia associated. The increase is also bigger for the patients who did not receive riluzole treatment.

In a non quantitative visual analyses we found two patients with amyloid deposits in hippocampus, one of them have frontotemporal dementia. No cognitive alteration was described in the other one.

4. c. Neurogenesis results

4. c. 1. Subventricular zone.

In the subventricular zone we found a modification of the niche structure. ALS patients have an increased size of GAP and ribbon layers. Each of them is two times bigger than in controls. This differences are statistical significative.

We also found an increase in proliferation of all cellular phases of neurogenesis from the earliest stages (B cells) to neuroblasts. So there is an increase in the proliferation with a neuronal differentiation. This increase is bigger for the patients with frontotemporal dementia associated (however as the sample of patients with frontotemporal dementia is of two we can not perform an statistical analysis). We found an increase in the B cells for all markers that is statistically significant for GFAP, Ki67 and PCNA but not for phosphohistone-3. Increase in B cells is from twice to thrice more than controls. Regarding GFAP this marker is present in glia and neural stem cells. In order to verify that in our case it stained true stem cells we observed that the cells expressing GFAP also expressed the other proliferation markers.

To stain the second type of cells, type C, NPCs we used δ GFAP. We also found an increase in proliferation of C cells in ALS patients (approximately 3 times that the number found in controls) that is statistically significant.

In the study of neuroblasts we used PSA-NCAM, doublecortin and Tuj-1. We found an increase in the staining for all the antibodies, however we can not quantify it for Tuj-1 stain because it was located at the prolongations and not the cell bodies. For all the other

cases the increase was statistically significant (approximately three times more neuroblasts than in controls).

We did not find any significant difference between patients receiving or not treatment with riluzol, spinal or bulbar disease and presence or absence of neuropsychiatric.

We also performed a regression analyses. We did not find any relationship between neurogenesis and age or total TDP-43. However we find that percentage of phosphorylated cytoplasmic TDP-43 correlated lineally and in a direct way with neurogenesis in all the cellular stages.

4. c. 2. Neurogénesis in the subgranular zone.

We did not find any modification in the size of the subgranular layer of ALS patients compared to controls. In the SGZ we found an increase in GFAP (4 times more in ALS patients than in controls) but it does not colocalize with others proliferation markers, so it does not stain stem cells but regular glia cells. In the other size microglia is reduced (aproximately a half than in controls) but with an ameboid morphology indicating that it is activated.

Regarding adult neurogenesis itself we found a reduction of proliferation affecting all cellular phases. From the earliest neuronal progenitor proliferative cells (type 1/type A), to intermediate NPCs type 2, type D1, to neuroblasts type 3, type D3. So, we found a reduction in all neural stem cells in SGZ, in the cases with associated frontotemporal dementia with some markers we were not able to find a single neural stem cells.

To analyze the first phase of the neurogenesis, neural progenitor proliferative cells, type 1, type A, we used PCNA, Ki-67 and PHOS-H3. In all cases we found a reduction in the number of these cells (five times less in ALS than in controls).

We analyzed the second phase (NPCs), type 2 / type D1 cells we studied δ GFAP. We found a significative reduction in the number of control cells (five time less cells in ALS vs. controls). These cells also have a different morphology more rounded and with less prolongations.

To study the neuroblasts cells, type 3, type D3 cells we performed PSA-NCAM, DCX and Tuj-1 staining, in all cases we found a reduction in the number of neuroblasts, however for the DCX and Tuj-1 staining we were not able to count the number of cells because only the cellular processes were marked. In the case of PSA-NCAM we found a marked reduction and statistically significant (approximately 15 times less in ALS patients than in controls).

We did not find any significant difference when we compare patients with or without riluzole treatment, with or without neuropsychiatric symptoms, with spinal or bulbar form at the beggining of the disease or between women and men.

In the correlation analysis with did not find any relation of neurogenesis with age or total TDP-43. However we found a significant correlation between the percentage of phosphorylated cytoplasmic TDP-43 and the modification in neurogenesis. This correlation was inverse and exponential. So, the more phosphorylated TDP-43 in the cytoplasm the less neurogenesis we found in the SGZ.

5. Discussion

There are few studies regarding neurogenesis in ALS. The only case published in humans belong to the sample of this study (Galan *et al.* 2011). All other works published study the transgenic mouse model for human mutations in *SOD1* (Guan *et al.* 2007, Warita *et al.* 2001, Chi *et al.* 2007, Chi *et al.* 2006). Most of them analyze central spinal niche (Guan *et al.* 2007, Warita *et al.* 2001, Chi *et al.* 2006). In this area authors found an increase in the proliferation that for some of them precede the beginning of symptoms and

for others appears at the same time that the disease. However another study showed an increase in proliferation but with glial and non neuronal differentiation (Guan *et al.* 2007). The only study on the classical niches found, as in our case, an increase in neurogenesis in subventricular zone (Chi *et al.* 2007), but they did not find any difference in subgranular zone.

In our study, we found an increase in the neurogenesis in the SVZ of necropsies of ALS patients. This increase affects to all cellular stages and, so on, it leads to a neuronal differentiation. This increase could be in relation with a potential restorative role of this niche. In the SGZ of the dentatus gyrus we found a very important reduction of all cellular phases of neurogenesis.

More studies are needed in order to know why these two niches have a different response to the disease. It could be considered that both niches have different regulators. However to the date no such a thing has been probed. Another possibility would be that the factor that increases neurogenesis in SVZ is not able to arrive to SGZ. For example, if this factor arrives to SVZ by CSF, it won't affect in the same degree to SGZ, because SGZ is too far away from CSF. The finding in DFT-ALS patients of neural stem cells that emit a prolongation passing through the ependymal cells to the lateral ventricle supports this hypothesis. Another possibility will be that the reduction in neurogenesis in dentatus gyrus could be a primary phenomenon in the pathogeny of ALS as it has been previously reported in other neurodegenerative diseases.

We have also found a correlation between the percentage of phosphorylated cytoplasmic TDP-43 and the way in which neurogenesis varies in every niche. So, the correlation is direct in the SVZ and inverse in the SGZ. We also need also specific studies designed to know if this relationship is causal, if a common factor that modifies both variables exists or if, as previously reported, phosphorylated cytoplasmic TDP-43 correlates with the propagation of the disease (Brettschneider *et al.* 2013).

6. Conclusions

We observed in the amyotrophic lateral sclerosis patients necropsies a modification of neurogenesis. This modification occurs in a different way for each niche: in the subventricular zone neurogenesis it is increased and in the subgranular zone it is reduced.

We found that this modification affects all stages of progenitor cells, from neural progenitor proliferative cells (type B -SVZ, type 1/type A-SGZ) to neural pluripotential cells (type C-SVZ, type 2/D1-SGZ) to neuroblasts (type A-SVZ, type 3, D3 SGZ). The structure of neurogenic niches is also modified.

This changes are more severe in the cases of ALS with associated frontotemporal dementia. We do not find other associations with clinical or brain image variables.

III. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el estudio de la neuroplasticidad en las enfermedades neurodegenerativas se ha considerado de máximo interés (Winner y Winkler 2015). La neuroplasticidad podría constituir una diana terapéutica para estas enfermedades, que no tienen tratamiento en el momento actual (Nathan *et al.* 2011, Foltynie 2015). Además, podría ser uno de los factores implicados en la etiopatogenia de la enfermedad (Winner y Winkler 2015).

La neurogénesis del adulto constituye una de las principales vías de la neuroplasticidad (Lepousez *et al.* 2015). En el humano se ha demostrado la existencia de dos nichos neurogénicos: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado en el hipocampo (GD) (Urban y Guillemot 2014). La función exacta de la neurogénesis en cada uno de estos nichos durante la vida adulta no se conoce bien, aunque se cree que la neurogénesis en el GD tiene un papel en la consolidación de la memoria (Kempermann *et al.* 2015) y que en condiciones fisiológicas la neurogénesis de la SVZ se relaciona con la respuesta al olfato, aunque esto último está más discutido en el humano (Lazarini y Lledo 2011). Con respecto a la modificación de la función de los nichos en condiciones patológicas, se cree que la neurogénesis en la SVZ puede, en estas situaciones, tener una función reparadora (Marti-Fabregas *et al.* 2010).

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se ha descrito una reducción de la neurogénesis tanto en el GD como en la SVZ (Winner y Winkler 2015). Con la excepción de la enfermedad de Huntington, en la que se ha descrito en el humano un incremento de la misma en la SVZ (Curtis *et al.* 2005), y la enfermedad de Alzheimer, en la que algunos autores sostienen que, dependiendo del estadio de la misma, la neurogénesis puede estar aumentada (en estadios iniciales) o reducida (en estadios finales) en la SVZ y el GD (Bossers *et al.* 2010, Winner y Winkler 2015).

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva para la que no existe un tratamiento curativo en el momento actual (Mancuso y Navarro 2015). Conocer cómo se modifica la neurogénesis en ella podría ser fundamental para comprender su etiopatogenia e incluso podría constituir una diana terapéutica. Ese es el objetivo del presente estudio.

III. a. Concepto de neurogénesis del adulto

El término neurogénesis del adulto se refiere al proceso por el cual se forman nuevas neuronas a partir de células madre localizadas en zonas concretas del sistema nervioso adulto y también a cómo estas células migran, se diferencian y se integran en su destino, hasta convertirse en células funcionales. El concepto de neurogénesis en los animales adultos es bastante antiguo. Se presentó por primera vez a la comunidad científica por Altman en los años sesenta (Altman 1962). La idea se recibió con mucha reserva por la comunidad científica. No es de extrañar, puesto que hasta entonces, se había considerado un axioma que la carga neuronal sólo se modificaba hasta poco tiempo después del nacimiento para después permanecer inmutable (Pirotte y Rogister 2008, Crespel *et al.* 2004, Ramon y Cajal 1928).

Hubo que esperar unos 20 años para que, a partir de unos estudios realizados en canarios, se le empezara a dar un cierto crédito al concepto de neurogénesis del adulto (Nottebohm 1989). No obstante, aun después de estos estudios se consideraba como una teoría que a lo sumo podría concernir a los pájaros y no se valoraba la posibilidad de que existiese neurogénesis en el cerebro de los mamíferos adultos.

El cambio más drástico se produce en los años noventa cuando se describen dos zonas del sistema nervioso que tienen células madre (células que se autorrenuevan y dan lugar a nuevas neuronas). Estas dos zonas son la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (GD) del hipocampo (Amrein y Lipp 2009, Bonfanti y Peretto 2011, Ming y Song 2005). El descubrimiento de estas zonas, que reciben el nombre de nichos neurogénicos, en diferentes especies fue fundamental para el desarrollo del concepto de neurogénesis. Estos nichos neurogénicos, no son solo una zonas que albergan células madre, sino que además crean un ambiente celular y humoral necesario para que se produzca la neurogénesis. Tal es

así, que si se colocan las células madre en zonas externas al nicho neurogénico, pierden sus características de pluripotencialidad y autoperpetuación.

Aunque el proceso ha sido largo, hoy en día se acepta la existencia de estos dos nichos neurogénicos en todas las especies. Sin embargo, probablemente existan otras zonas que se comportan como nicho neurogénicos. Así como se consideran como tales la zona periependimaria de la médula, sustancia nigra e hipotálamo (Morest 1970, Guan *et al.* 2007, Hugnot y Franzen 2011, Yoshimi *et al.* 2005). Es posible, no obstante, que, a diferencia de los nichos neurogénicos clásicos, estas zonas no tengan potencial neurogénico en condiciones fisiológicas y se activen sólo bajo determinadas condiciones patológicas.

La confirmación de que la neurogénesis ocurre en el cerebro adulto tiene profundas implicaciones en nuestro conocimiento del desarrollo y funcionamiento del mismo, y abre nuevas posibilidades a la terapia celular en el sistema nervioso central (Gage *et al.* 1995a, Temple y Alvarez-Buylla 1999). La neurogénesis parece persistir a lo largo de toda la vida, y probablemente en mayor cuantía de lo que se pensaba inicialmente, pero muchas de las neuronas recién formadas se pierden y no se integran. El concepto de neurogénesis del adulto se ha relacionado íntimamente con el de la neuroplasticidad, de forma que actualmente el concepto de neuroplasticidad incluye, entre otros procesos, la formación de nuevas neuronas, aunque también, por ejemplo, la formación de nuevas dendritas.

La función de esta neurogénesis no se conoce exactamente. De hecho, dado que el número de neuronas que se forma es pequeño, si las nuevas neuronas tuvieran la misma función que las ya constituidas tendríamos que considerar la neurogénesis como un proceso insignificante (Nottebohm 2002). Sin embargo si estas neuronas tuvieran diferentes propiedades, su integración constante en los circuitos neuronales podría tener un efecto importante. Las últimas investigaciones favorecen esta segunda hipótesis. Las células recién formadas parecen mucho más plásticas que las células maduras y se

influyen por factores externos como hormonas o ejercicio (Kempermann 2002). La neurogénesis adulta podría permitir a las neuronas mantener una mejor comunicación con el medio, responder a experiencias y situaciones vitales y tener un papel en la memoria en el caso de la neurogénesis hipocámpal o en el olfato en el caso de la SVZ. De hecho se ha estudiado de forma detallada cómo la neurogénesis se modifica con diferentes patologías neurológicas (Kaneko y Sawamoto 2009, Vandenbosch *et al.* 2009) -agudas como el ictus (Ohab *et al.* 2006) o crónicas neurodegenerativas (Steiner *et al.* 2006b, Thompson *et al.* 2008, Armstrong y Barker 2001, Zhao *et al.* 2008)- así como de las psiquiátricas como la esquizofrenia (Reif *et al.* 2006) y la depresión (Muller *et al.* 2001)-.

Una de las principales funciones de la neurogénesis podría ser aumentar la capacidad de adaptación, por ello es crucial conocer los factores que la modifican ya sea reduciéndola o aumentándola (Malberg *et al.* 2000, Warner-Schmidt y Duman 2006, Ma *et al.* 2012, Charalampopoulos *et al.* 2008). Los factores que incrementan la neurogénesis son el ejercicio, el aprendizaje y las hormonas sexuales (Ma *et al.* 2012) y los que lo reducen son el envejecimiento (Mirochnic *et al.* 2009, Luo *et al.* 2006) y el estrés (Dong *et al.* 2004). Por otro lado, es de vital importancia conocer las sustancias que actúan como señales iniciadoras y reguladoras de esta neurogénesis del adulto (Hagg 2005, Grote y Hannan 2007, Mu *et al.* 2010, Ninkovic y Gotz 2007) y todas aquellas moléculas que administradas externamente pueden llegar a modificarla, entre las cuales se encuentran los esteroides y otras hormonas (Galea *et al.* 2006, Charalampopoulos *et al.* 2008, Brinton y Wang 2006a, Mayo *et al.* 2005) y numerosos fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, como los neurolépticos y antidepresivos (Malberg *et al.* 2000, Grote *et al.* 2005).

III.b. Neurogénesis adulta en el hipocampo

Es en este nicho donde se describió por primera vez la neurogénesis y se considera el más importante cuantitativamente en condiciones fisiológicas (Amrein y Lipp 2009). Aunque de forma general hablamos de neurogénesis en el hipocampo, en realidad la neurogénesis se circunscribe al giro dentado (GD). La neurogénesis del hipocampo produce células granulares del giro dentado. Aunque algunos autores creen que se pueden generar otro tipo de células hasta ahora esto no se ha confirmado (Rietze *et al.* 2000, Liu *et al.* 2003). Las células precursoras que dan lugar a las nuevas neuronas se encuentran en una banda estrecha localizada entre la capa granular y el hilus, esta banda recibe el nombre de zona subgranular (SGZ). La descripción original de la neurogénesis del adulto en esta zona en el cerebro roedor fue publicada por Altman y Das (Altman y Das 1965).

El nicho de la SGZ incluye las células precursoras proliferativas propiamente dichas, a las que algunos autores clasifican como células tipo I, y otros células A, en este nicho, sus descendientes directas (las células neurales pluripotenciales, NPCs, tipo 2, o células D1) y las neuroblastos, tipo 3 o tipo D3. Incluye además otras células gliales y endoteliales, probablemente células inmunes, microglía, macrófagos y matriz extracelular. La SGZ está rodeada por una membrana basal (Mercier *et al.* 2002). El nicho provee un ambiente único que permite que se produzca el desarrollo de las neuronas (Alvarez-Buylla y Lim 2004, Ma *et al.* 2005). Muchos autores han encontrado evidencias de que son los astrocitos los que juegan un papel fundamental en el nicho promoviendo la neurogénesis. Así, estos presentan una relación espacial estrecha con las nuevas neuronas (Plumpe *et al.* 2006). Igualmente cuando se estudian cultivos neuronales, los astrocitos y las sustancias derivadas de los astrocitos son potentes inductores de la neurogénesis del adulto (Song *et al.* 2002). De hecho algunos autores han conseguido producir neuronas fuera de los nichos neurogénicos utilizando sustancias producidas por los astrocitos de la SGZ (Jiao y Chen 2008).

La neurogénesis comienza con una célula radial de aspecto glial que pasa por 3 estados de célula progenitora con una alta actividad proliferativa (células pluripotenciales proliferativas -I-, células neurales pluripotenciales -II- y neuroblastos -III-) y después a una fase de maduración postmitótica y finalmente la producción de nuevas células granulares (Brandt *et al.* 2003, Filippov *et al.* 2003). La fase precursora permite la expansión del conjunto de células que podrían diferenciarse en neuronas. La fase de supervivencia precoz marca la salida del ciclo celular. De forma que la mayor parte de las neuronas recién formadas son eliminadas pocos días después de su nacimiento. Durante la fase de maduración postmitótica se produce el establecimiento de conexiones funcionales, el crecimiento de axón y dendritas y la sinaptogénesis, es decir, en ella la neurona se convierte en funcional. La fase de supervivencia tardía es una especie de periodo de “puesta a punto”. Todo este proceso dura unas 7 semanas. Además de las diferencias morfológicas de los diferentes estadios parecen existir también diferencias electrofisiológicas y de la estabilidad de la membrana.

Aunque la neurogénesis del adulto es muy similar funcionalmente a la que se produce en la fase embrionaria (Laplagne *et al.* 2006) la calidad y la cantidad de los estímulos y de las propias actividades mnésicas que ocurren en el giro dentado son claramente diferente en la fase postnatal y la embrionaria (Lemasson *et al.* 2005).

Giro dentado

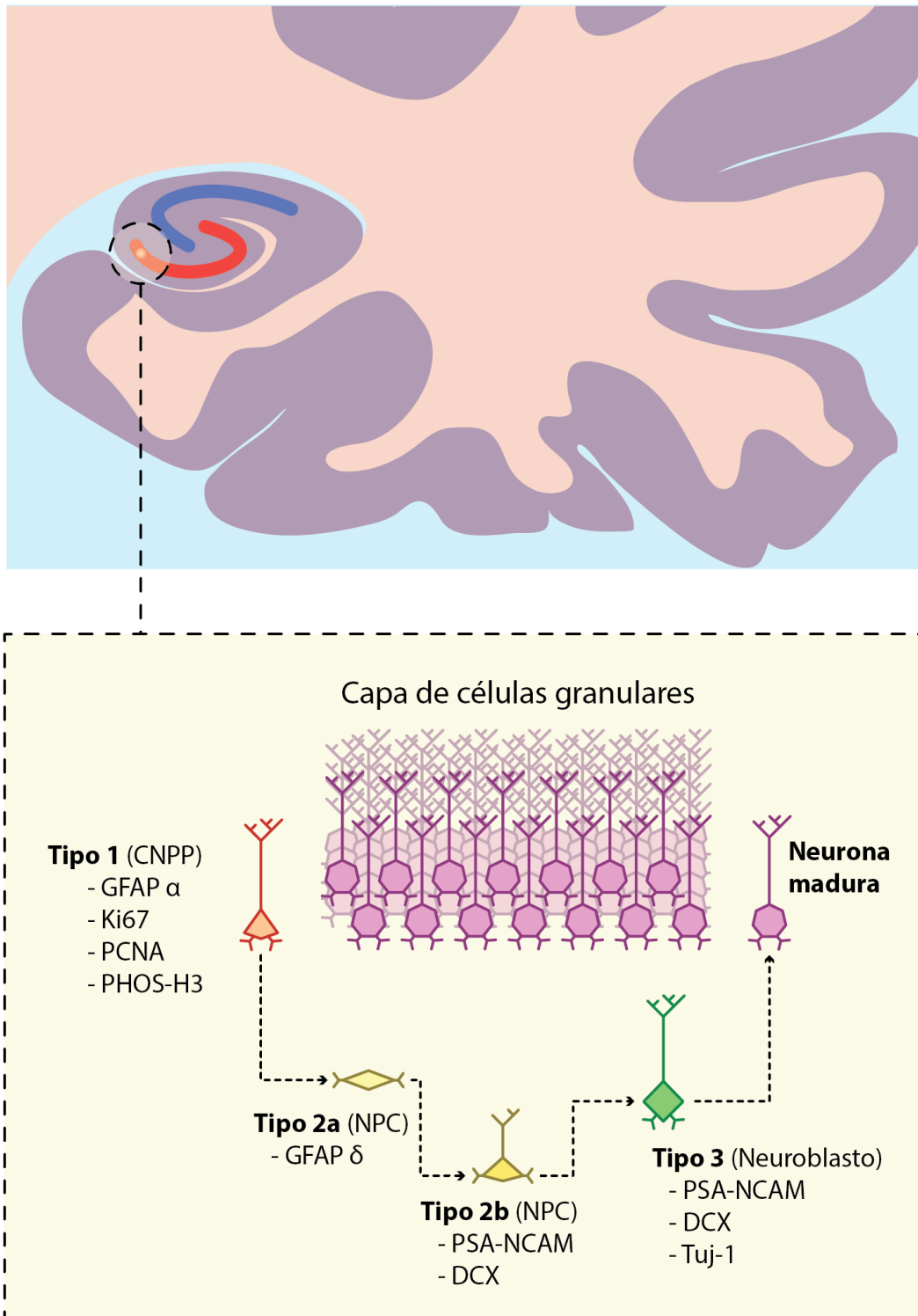


Imagen 1 : Neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado. El dibujo esquematiza la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Incluyendo las células implicadas desde la célula tipo 1 o A, pasando por las NPCs tipo 2 o D1, hasta los neuroblastos o células tipo 3 o D3. Debajo de cada tipo de célula puede observarse los anticuerpos utilizados para marcarlas.

III.b.1. La fase de células precursoras

La neurogénesis del adulto se origina de una población de células precursoras con propiedades gliales. Una parte de ellas tienen características morfológicas y antigénicas de glía radial. Su cuerpo celular se localiza en la SGZ y la prolongación apical se extiende hasta la capa molecular (Seri *et al.* 2001). Las células gliales radiales, también conocidas como células precursoras tipo 1 o A, dan lugar a células progenitoras intermedias, tipo 2 o D1, con una gran actividad proliferativa. Algunas de estas últimas expresan marcadores gliales pero ya no tienen una morfología radial (células tipo 2a). Dentro de las células tipo 2 que expresan nestina se encuentran algunas con marcadores para los factores de transcripción NeuroD1 y Prox1. A este fenotipo se le llama células 2b (Steiner *et al.* 2006a). De ellos el fenotipo Prox1 es específico de las células granulosas. No se sabe bien qué controla esta evolución de fenotipos en la neurogénesis del adulto, aunque parece claro que el nivel crítico, donde se producen los cambios que finalmente determinarán el destino de las células, es el de las células tipo 2a. Uno de los marcadores de la línea neuronal que primero aparecen en las células tipo 2b es la doblecortina (DCX). La expresión de doblecortina va desde este estado proliferativo hasta el periodo de maduración postmitótica durante un total de unas 2-3 semanas (Brandt *et al.* 2003, Plumpe *et al.* 2006). La fase en la que se expresa doblecortina se superpone prácticamente de forma constante con la PSA-NCAM.

III.b.2. Fase de la supervivencia precoz

Prácticamente tras la salida del ciclo mitótico, las nuevas neuronas expresan de forma transitoria marcadores postmitóticos como el NeuN y calretinina (Brandt *et al.* 2003). Estos marcadores se observan muy precozmente y luego se van eliminando, lo que se corresponde con una gran pérdida de las neuronas recién formadas en esa segunda fase. De hecho la mayor parte de las células son eliminadas bastante antes de haber conseguido establecer conexiones en CA3 o recibir aferencias dendríticas en la capa molecular. Este proceso de eliminación se produce a través de apoptosis (Kuhn *et al.* 2005).

El momento en el que se desarrollan las dendritas es muy variable, aunque una vez este se inicia el curso temporal es bastante estable. Días después de la salida del ciclo mitótico, las nuevas células envían su axón al área CA3 donde forman sinapsis. La principal aferencia sináptica es gabaérgica y excitatoria. El GABA cambia a su función inhibitoria solo cuando se han formado suficientes contactos glutamatérgicos y, probablemente, cuando las células han empezado a desarrollar su propio fenotipo neurotransmisor glutamatérgico (Tozuka *et al.* 2005). La acción del GABA por si misma conlleva la maduración neuronal de estas células y promueve la integración sináptica (Ge *et al.* 2006). Desde un punto de vista cuantitativo, la mayor parte de la regulación ocurre en este estado del desarrollo y no en la fase de expansión como podría pensarse (Kempermann *et al.* 2006). Al parecer, las células que han sobrevivido las 2 primeras semanas se establecerán e integrarán de forma persistente en el giro dentado. Desde ese momento, no se producen grandes cambios en relación al número de células.

III.b.3. Fase de la maduración postmitótica

En modelos animales que expresan la POMC se ha estudiado la formación de las dendritas. Se sabe que la elongación del axón es anterior al desarrollo de las espinas dendríticas (Zhao *et al.* 2006). Los contactos del axón con CA3 ocurren hacia los 10 días y las primeras espinas dendríticas aproximadamente una semana después. Se ha visto que las células maduran desde un estado en el que tienen una gran resistencia a las aferencias hasta tener las propiedades normales de las células granulares maduras (van Praag *et al.* 2002, Kempermann *et al.* 2015).

III.b.4. Fase de maduración tardía

De todas ellas, es la fase peor conocida. El periodo de expresión de la calretinina dura unas 3-4 semanas, y corresponde con el periodo de maduración dendrítica.

Aparentemente, una vez que la neuronas se integran en la red neuronal, cambian su expresión del calretinina a calbindina (Brandt *et al.* 2003). Es necesario que transcurran varias semanas hasta que las nuevas células adquieran las mismas propiedades electrofisiológicas que las neuronas maduras (van Praag *et al.* 2002). Una vez que se han formado las conexiones sinápticas glutamatérgicas las neuronas entran en una fase de plasticidad sináptica aumentada. En esta fase, el umbral para inducir potenciación a largo plazo en estas neuronas es menor que en las células granulares (Schmidt-Hieber *et al.* 2004). Este período de mayor susceptibilidad dura aproximadamente un mes y y medio tras la formación de las células (Ge *et al.* 2007).

III.c.Neurogénesis adulta en la zona subventricular y bulbo olfatorio

A pesar de que el hipocampo es la zona con mayor actividad neurogénica, en extensión la zona mayor de neurogénesis del adulto se localiza en la pared lateral del ventrículo lateral, zona subventricular (SVZ) (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo 2002, Doetsch y Alvarez-Buylla 1996). Las nuevas neuronas que se generan en esta zona se incorporan al bulbo olfatorio (BO), este proceso ocurre a lo largo de toda la vida (Pencea *et al.* 2001, Molofsky *et al.* 2006). Los neuroblastos que se forman en la zona subventricular migran una gran distancia hasta llegar al BO donde se dispersan y se diferencian en interneuronas. La mayoría de estas neuronas se integran en circuitos funcionales (Belluzzi *et al.* 2003) y aproximadamente la mitad de ellas sobrevive a largo plazo (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002). La SVZ del adulto es también el lugar donde se forman los oligodendrocitos tanto en el cerebro normal como en ciertas patologías (Menn *et al.* 2006, Parent *et al.* 2006). En los últimos años, se ha conseguido demostrar que este sistema posee células pluripotenciales que pueden ser cultivadas *in vitro* (Sanai *et al.* 2004). Cuando se cultivan estas células, observamos que se pueden diferenciar en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage *et al.* 1995b, Weiss *et al.* 1996b, McKay 1997, Scheffler *et al.* 2005). Algunos autores consideran que en el humano este nicho presenta poca actividad neurogénica desde un punto de vista cuantitativo en condiciones fisiológicas y que existe un verdadero camino migratorio al bulbo, pero que es capaz de activarse en condiciones patológicas (Quinones-Hinojosa *et al.* 2007). Por lo que además se considera la SVZ como un posible reservorio, que podría estimularse terapéuticamente para conseguir precursores neurales que sirvan para reparar el cerebro enfermo o dañado (Lie *et al.* 2004, Lim *et al.* 2007).

III.c.1. El nicho neurogénico SVZ

La estructura del propio nicho SVZ es fundamental para que se produzca la neurogénesis. Así, si transplantamos células SVZ de un ratón a la zona SVZ de otro ratón

dan lugar a gran cantidad de interneuronas BO en el receptor (Lois y Alvarez-Buylla 1994), pero si estas mismas células se transplantan a una zona no neurogénica producen pocas neuronas o incluso ninguna (Herrera *et al.* 1999). Incluso cuando se transplantan a una zona no neurogénica neuroblastos purificados de la zona SVZ solo consiguen dar lugar a células gliales (Seidenfaden *et al.* 2006). Por otro lado, si se introducen células progenitoras del hipocampo en la SVZ dan lugar a interneuronas (Suhonen *et al.* 1996).

El nicho neurogénico SVZ en el humano está formado por 3 capas. En primer lugar, capa endimaria que está en contacto directo con el ventrículo lateral es una capa monocelular formada por células endimarias, estas células tienen prolongaciones que contactan con los astrocitos en la siguiente capa o capa GAP (Quinones-Hinojosa y Chaichana 2007). En segundo lugar, la capa hipocelular o capa GAP. Esta segunda capa esta compuesta fundamentalmente por prolongaciones de los astrocitos y de las células endimarias y posee pocos cuerpos celulares. Se ha atribuido a esta capa una función reguladora y de control de la proliferación de la neurogénesis y de la diferenciación posterior. Para algunos la capa GAP regula también la migración de las células (Quinones-Hinojosa y Chaichana 2007). La capa GAP no existe en los roedores. La tercera capa es la capa *ribbon* o capa astrocitaria, los astrocitos que forman parte de esta capa tienen capacidad de dar lugar a neuroesferas, es decir tienen diferenciación neural. En esta capa existen también oligodendrocitos, cuya función exacta se desconoce.

III.c.1.a.Composición celular del nicho neurogénico

La SVZ del ratón adulto se componen fundamentalmente por cuatro tipos de células (A, B, C y células endimarias). Éstas se definen por sus características morfológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales (Doetsch *et al.* 1997). Los neuroblastos jóvenes (células tipo A) se forman a lo largo de toda la SVZ que se extiende a lo largo del ventrículo lateral y migran en cadenas (Lois *et al.* 1996) hacia el bulbo olfatorio (BO) a través de una red de caminos interconectados que se distribuyen por la pared del ventrículo lateral (Doetsch y Alvarez-Buylla 1996). Estas vías convergen en la SVZ anterior donde la

confluencia de las cadenas de células de tipo A, forma la corriente migratoria rostral (RMS) una vía que llega a la zona central del BO. Una vez en el BO las células tipo A salen de las cadenas y migran radialmente a capas más superficiales donde se diferencian en células granulares e interneuronas periglomerulares (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002).

Las cadenas de células tipo A en el cerebro del ratón adultos están rodeadas por astrocitos con propiedades de células neurales proliferativas (células tipo B) (Lois *et al.* 1996, Doetsch *et al.* 1997). Las células tipo B expresan el marcador de astrocitos proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y tienen ultraestructura típica de astrocitos. A pesar de que tradicionalmente se consideraba a la glía como una estructura de soporte, se ha podido ver que éstas células tienen funciones de NPCs (Doetsch *et al.* 1999, Garcia *et al.* 2004). Estas células tipo B provienen de la glía radial (Merkle *et al.* 2004), que en el cerebro embrionario actúan como precursores neurales pluripotenciales (Merkle y Alvarez-Buylla 2006). Se ha sugerido recientemente que la migración entre la SVZ y la BO continua en el cerebro adulto (Curtis *et al.* 2007c), aunque existen dudas al respecto. Además de tener función de NPCs los astrocitos de la SVZ constituyen importantes células en el nicho, de hecho, están en contacto con todos los otros tipos celulares de la SVZ (Alvarez-Buylla *et al.* 2001). Así pues, parece que la proximidad cercana de los astrocitos con las NPCs es uno de los factores importantes del nicho neurogénico. Distribuidas a lo largo de las cadenas de células tipo A y muchas veces entre las células tipo A y tipo B hay grupos de células tipo C (Doetsch *et al.* 1997). Las células tipo C parecen tener una función amplificadora entre las células tipo B y tipo A. Al igual que en el caso de las células tipo B cuando se aíslan y se cultivan pueden dar lugar a NPCs (Doetsch *et al.* 2002).

La capa endimaria que rodea el ventrículo no es totalmente continua. De forma que en el cerebro del ratón sano algunas de las células tipo B hacen contacto directo con la pared del ventrículo extendiendo un fino proceso celular que pasa entre las células endimarias, mientras que otras tienen una superficie luminal mayor. Las células tipo B que contactan el ventrículo poseen un cilio alargado, que no tienen el par de microtubulos centrales (Doetsch *et al.* 2002). Un cilio similar se ha descrito en las células

neuroepiteliales embriónicas (Stensaas y Stensaas 1968) y en el cerebro de aves adultas (Alvarez-Buylla *et al.* 1998). Aunque se ha sugerido que las células endoteliales podrían sufrir mitosis y funcionar como células madre (Johansson *et al.* 1999) la mayor parte de los estudios no han encontrado estos resultados (Spassky *et al.* 2005). A pesar de ello, las células endoteliales probablemente juegan un papel importante en el nicho neurogénico.

Igualmente los vasos, la microglía y la membrana basal parecen contribuir de forma importante al nicho neurogénico (Mercier *et al.* 2002). Se cree que la membrana basal podría concentrar o modular factores de crecimiento derivados de las células locales. Probablemente esta relación con la membrana basal es especialmente importante para que las células tipo B sean capaces de mantener sus propiedades de células madre (Alvarez-Buylla y Lim 2004). En el caso de las células endoteliales cuando estas se cocultivan con explantes SVZ facilitan la migración y la maduración de los neuroblastos (Leventhal *et al.* 1999), además estos cultivos secretan factores solubles que estimulan la perpetuación de las NSC embriónicas y aumentan la producción de las NSC de la SVZ en el adulto (Shen *et al.* 2004). Las células microgliales producen factores solubles importantes para la neurogénesis en la SVZ pero no para la perpetuación celular (Walton *et al.* 2006). No se conocen todos los factores que actúan en el nicho neurogénico pero hay algunas evidencias a favor de la importancia del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de las células endoteliales (Leventhal *et al.* 1999, Mohapel *et al.* 2005) y del factor inhibidor de la leucemia derivado de la microglía (LIF) (Nakanishi *et al.* 2007).

La mayor parte de los oligodendrocitos se producen durante la embriogénesis o en las fases precoces de la vida tras el nacimiento, pero algunos oligodendrocitos se producen durante la vida adulta. De hecho, en cerebros en los que existen lesiones desmielinizantes, las células SVZ en el ratón migran hasta las lesiones y generan oligodendrocitos (Picard-Riera *et al.* 2002) y estudios en necropsias parecen confirmar estos resultados (Chang *et al.* 2008). Las células B de la SVZ funcionan también como precursores de los oligodendrocitos en el cerebro adulto (Menn *et al.* 2006).

La constitución celular del nicho neurogénico SVZ en el humano adulto es muy similar a la del ratón. Existen igualmente células neurales progenitoras proliferativas, tipo B, un estadio intermedio, las células tipo C o células neurales pluripotenciales y finalmente las células tipo A o neuroblastos. Sin embargo, se discute si existe o no un verdadero camino migratorio rostral y si esta zona en el humano en condiciones fisiológicas tiene una actividad neurogénica alta(Quinones-Hinojosa *et al.* 2007).

Zona subventricular

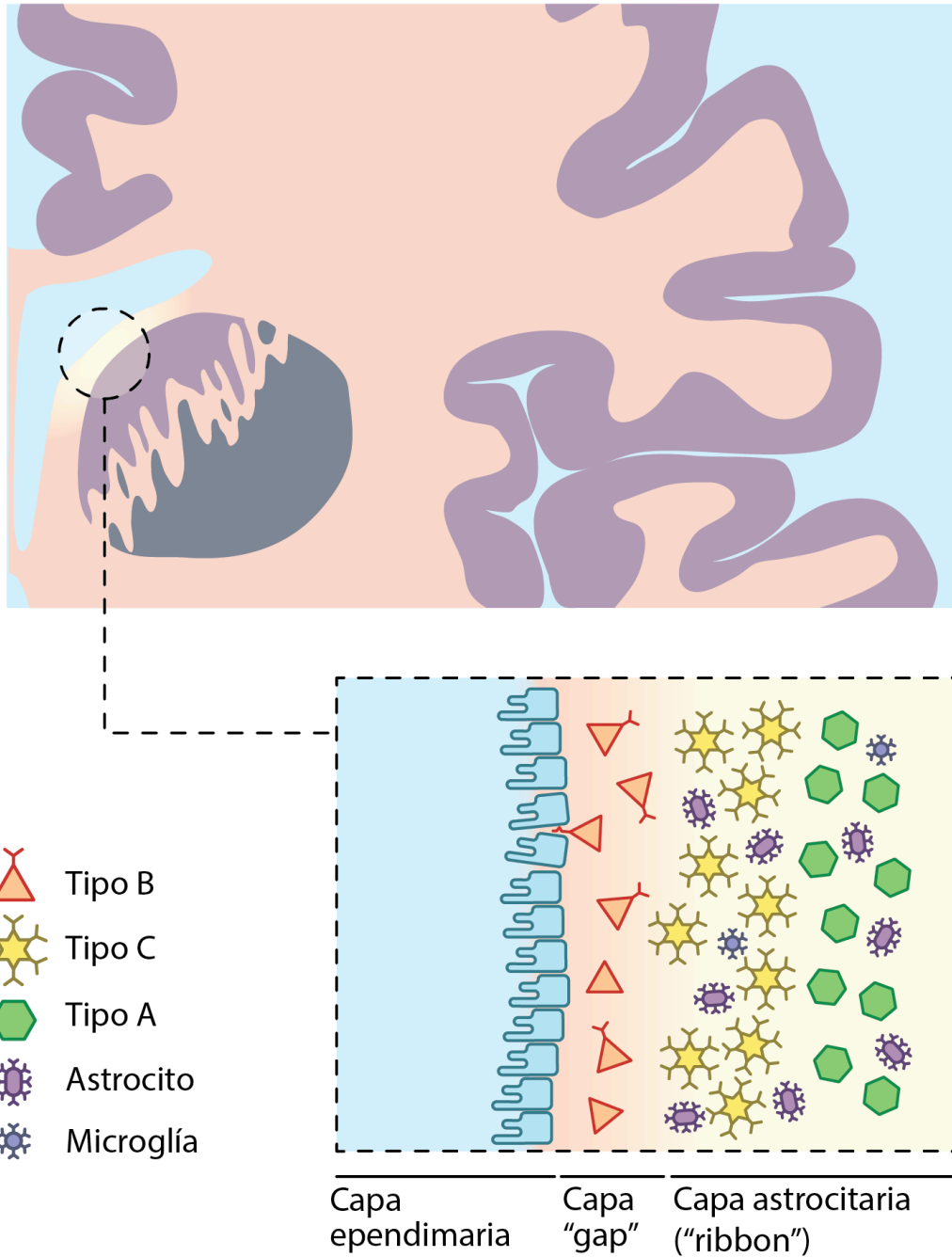


Imagen 2: Neurogénesis en la zona subventricular en el humano. El dibujo esquematiza la composición de las diferentes capas del nicho SVZ en sanos, así como su tamaño relativo normal. En él podemos observar la situación normal de las diferentes fases celulares de la neurogénesis, desde las células tipo B (neurales progenitoras proliferativas) hasta los neuroblastos (células tipo A).

III. d. Otros potenciales nichos neurogénicos

III.d.1. Nicho medular periventricular

La existencia de células madre en la zona periventricular del canal endimario medular se conocía ya hace algún tiempo (Weiss *et al.* 1996a, Johansson *et al.* 1999, Martens *et al.* 2002) . De hecho, se pueden cultivar neuroesferas a partir de células madre extraídas de zonas lumbares del canal endimario de ratones adultos (Weiss *et al.* 1996a). Sin embargo estas células son escasas y solo recientemente se ha descrito que forman parte de un verdadero nicho neurogénico (Hamilton *et al.* 2009). Por otro lado, existen diferencias significativas entre este y otros nichos neurogénico. Así a diferencia del SVZ en el nicho endimario medular no parecen ser los astrocitos las células neurales progenitoras sino las propias células del canal endimario (Meletis *et al.* 2008) . Otra característica de este nicho y muy probablemente de otros de los nichos no clásicos, es que en condiciones basales se mantiene relativamente poco activo, sin embargo parece que se activa de forma importante cuando se producen lesiones, fundamentalmente lesiones que afectan directamente a la médula. Este hecho se describió inicialmente para el daño medular traumático en el que se producen fundamentalmente astrocitos y glía, pero también parecen activarse dando lugar a neuronas en los modelos experimentales transgénicos de esclerosis lateral amiotrófica (Liu y Martin 2006).

Además, el canal central tiene algunas similitudes con las SVZ. Alrededor del canal central se observan astrocitos GFAP + que se extienden hacia el endimo y algunos, escasos cuyas proyecciones son dorsales. Sin embargo a diferencia de en la SVZ pocas células son Ki-67 + y por tanto pocas se encuentran en fase de proliferación (Hamilton *et al.* 2009). A diferencia de la SVZ el canal central endimario no tiene como tal una capa subependimaria diferenciada. Pero sin embargo, en esa zona si que existen muchas células que expresan marcadores similares a los de la SVZ (Hamilton *et al.* 2009). Curiosamente, en este nicho las células que proliferan se encuentran localizadas dorsalmente (Horner *et*

al. 2000). Cuando se estudió como se distribuían estas células en fase proliferativa se distribuyen con un claro gradiente dorsal-ventral, de forma que en la zona dorsal hay tres veces más células proliferativas que en la zona ventral.

Se ha comprobado que tanto la SVZ como el giro dentado tienen una estrecha relación con zonas vascularizadas (Palmer *et al.* 2000, Shen *et al.* 2008, Tavazoie *et al.* 2008). En el caso del canal central medular existe también una importante cercanía de las células en fase proliferativa con los vasos (Hamilton *et al.* 2009). Todo ello hace pensar que probablemente la regulación neuronal se realiza gracias a factores liberados al torrente sanguíneo (Tavazoie *et al.* 2008).

A diferencia de los nichos neurogénicos clásicos, el nicho neurogénico del canal medular central se mantiene relativamente quiescente. De hecho, la proliferación solo se activa significativamente *in vitro* o tras lesión medular (Frisen *et al.* 1995, Johansson *et al.* 1999, Martens *et al.* 2002, Meletis *et al.* 2008, Liu y Martin 2006). Por este motivo se hipotetiza que probablemente la acción de este nicho sea de reparación a nivel local. De forma que en condiciones basales probablemente se encarga solo de la reposición de células endimarias locales.

III.d.1.a. El nicho neurogénico medular central en el humano

Se conoce poco sobre el nicho neurogénico medular central en el humano. La mayor parte de los autores consideran que este nicho está obliterado y prácticamente ausente, algunos incluso lo describen como substituido por una estructura parecida al endimoma (Garcia-Ovejero *et al.* 2015). Está igualmente discutido si su estructura es diferente a la de otros primates (Garcia-Ovejero *et al.* 2015, Alfaro-Cervello *et al.* 2014). Los trabajos sobre su modificación en el humano ante situaciones patológicas arrojan resultados contradictorios (Alfaro-Cervello *et al.* 2014, Garcia-Ovejero *et al.* 2015). Nuestro grupo ha participado en un estudio en el que se comparaba el nicho central medular en primates, humanos adultos y niños. Entre los humanos adultos se incluyeron

dos pacientes con ELA. El nicho central medular se encontraba obliterado y existían algunos marcadores de proliferación, pero no había suficientes datos para definir si esa proliferación era diferente a los adultos sin patología (Alfaro-Cervello *et al.* 2014).

III.d.2. Sustancia nigra

El caso de la sustancia nigra es aún más discutido que el de la zona medular central. Si bien parece claro que existen células proliferativas en ella, la mayor parte de los autores consideran que estas células dan lugar sobre todo a oligodendrocitos y en menor medida a glía, fundamentalmente microglía (Frielingsdorf *et al.* 2004). Por otro lado está bastante admitido que estas células tienen la capacidad de dar lugar a neuronas (Lie *et al.* 2002). Por ello, algunos autores consideran que podría haber una verdadera neurogénesis en la sustancia nigra (Zhao *et al.* 2003, Shan *et al.* 2006).

Es especialmente llamativo que en el caso de la sustancia nigra, como en el de otros nichos neurogénicos, la actividad física es uno de los principales reguladores de la misma, pero con la particularidad de que para poder realizar este papel necesita de la coexistencia de dopamina ya sea endógena o exógena (Klaissle *et al.* 2012, Borta y Hoglinger 2007). Esto podría estar en relación con la afectación de la proliferación celular, sobre todo de la oligodendrogénesis que se observa en la enfermedad de Parkinson (Marxreiter *et al.* 2012).

III. e. Significado funcional de la neurogénesis

La neurogénesis adulta es un proceso que se mantiene de forma bastante estable a lo largo de la evolución. La continuidad de la neurogénesis en la vida adulta de forma relativamente restringida a algunas zonas plantea la cuestión de cuál es su función y si es un proceso estable en cantidad o se modifica conforme a las necesidades internas y externas del individuo (Kempermann 2002, Abrous *et al.* 2005). Por ejemplo, se correlaciona la neurogénesis con la capacidad cognitiva del individuo y probablemente constituyen una estrategia que permite al individuo adaptarse a los cambios del medio. Pero, ¿por qué? ¿Es necesario que las neuronas sean inmaduras para ejercer su función o mas bien suponen solo una mayor disponibilidad numérica?. Y ¿es esta la función de todos los nichos neurogénicos? Desde luego, parece que la presencia de la neurogénesis en la vida adulta es un mecanismo que el cerebro utiliza para mantener su plasticidad y flexibilidad en morfología y función (Lledo *et al.* 2006). De hecho, se entiende la neurogénesis es un proceso dinámico que permite al cerebro adaptarse a las situaciones cambiantes del ambiente o internas que ocurren de forma constante.

La neurogénesis podría suponer una ventaja evolutiva. Se ha visto que las especies de pájaros que almacenan comida durante el otoño para después recuperarla en el invierno presentan hipocampos mayores que los que no tienen este comportamiento (Healy y Krebs 1993), en estos pájaros en el otoño se produce un incremento del número de neuronas reclutadas en el hipocampo. Por otro lado, si estas nuevas neuronas se integran, ¿no dará esto lugar a una inestabilidad del sistema y provocara mas bien una disfunción? (Abrous *et al.* 2005). En resumen, a pesar de los estudios realizados aún en nuestros días se desconoce el verdadero significado funcional de la neurogénesis y si este es el mismo en los diferentes nichos.

III.e.1. Significado funcional de la neurogénesis en el bulbo olfatorio/SVZ

Las interneuronas del bulbo olfatorio juegan un papel fundamental en la sincronización de las proyecciones de las neuronas. Uno de los mecanismos que permite regular las interneuronas es la neurogénesis del adulto. A lo largo de la vida de los mamíferos se producen de forma continua células periglomerulares (GABAérgicas y dopaminérgicas) y granulares (GABAérgicas) (Altman 1969) . A pesar de que muchas de ellas se eliminan, unas 30000 se integran cada día en el circuito del bulbo olfatorio (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002), son en su mayor parte células granulares y en muy pequeña proporción periglomerulares y astrocitos. Se desconoce qué es diferente en esas neuronas que se integran y cuáles son los procesos que participan en la selección de las mismas. De las neuronas que se integran una gran parte (prácticamente la mitad) se elimina en la primera semana (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002, Winner *et al.* 2002). Además esta tasa de neuronas que sobreviven varía mucho con la edad (Lemasson *et al.* 2005). Aún así la actividad sensorial es uno de los factores mas importantes a la hora de regular la supervivencia de estas neuronas, no obstante para que tenga efecto esta regulación debe ocurrir en un periodo de tiempo específico (Yamaguchi y Mori 2005) que en los ratones corresponde aproximadamente al tiempo de formación de las sinapsis.

Se desconoce cuál es la misión de estas nuevas neuronas que se integran en el bulbo olfatorio (Lledo *et al.* 2006). Una de sus principales funciones sea aumentar la plasticidad de las redes neuronales. Esta regulación podría ocurrir ya tan precozmente como en la SVZ (Morshead y van der Kooy 1992) donde parece que la privación de olfato también reduce la tasa de proliferación de las NPCs (Corotto *et al.* 1994). Puesto que el bulbo olfatorio está relacionado con la consolidación de la memoria olfativa, podría ser que la neurogénesis colaborase de forma positiva con la misma. De hecho, se ha podido observar en los modelos animales que si se les expone a un ambiente rico en estímulos olorosos el número de neuronas en el bulbo olfatorio se duplica. Esta duplicación probablemente se produzca a expensas de reducir la muerte de las células (Rosenzweig y Bennett 1996). Igualmente los animales que presentan una mayor neurogénesis son capaces de mantener la memoria olfativa durante mayores periodos de tiempo (Rocheffort *et al.* 2002). En los humanos las neuronas recién formadas también podrían modular el olfato (Curtis *et al.* 2007a).

Si esta neurogénesis puede tener en algún momento un intención regeneradora o no, es una de las mayores dudas que persisten. A favor de este posible papel regenerador del nicho SVZ se encuentra el aumento de la neurogénesis en esta localización ante agresiones agudas como el ictus (Barkho y Zhao 2011).

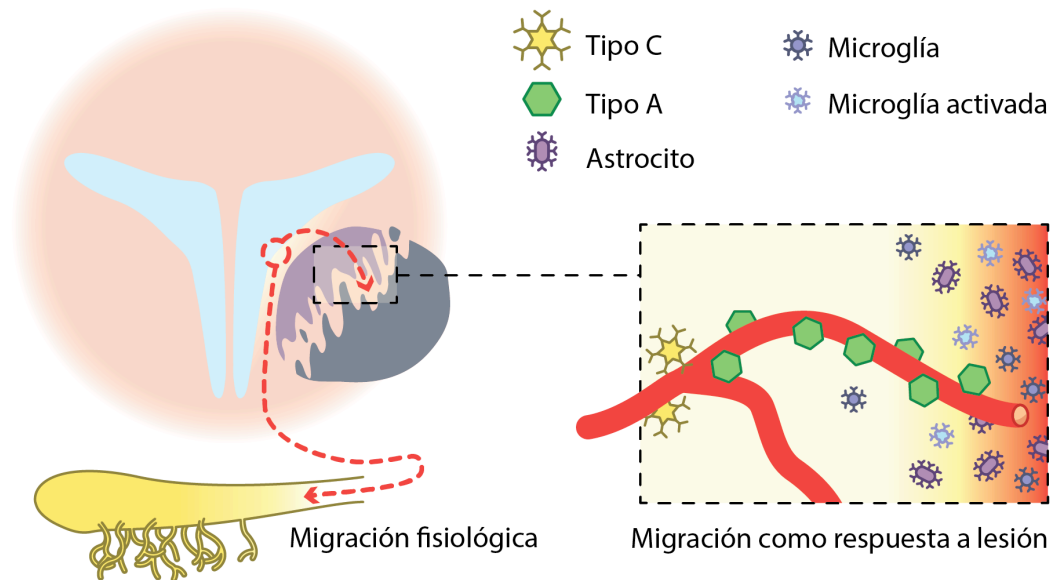


Imagen 3: Posible función de la neurogénesis en la SVZ en condiciones fisiológicas y patológicas. El dibujo esquematiza la función atribuida a la neurogénesis de la SVZ, en condiciones normales se cree que las células migran al bulbo olfatorio, en condiciones patológicas los neuroblastos migran hacia las zonas dañadas.

III.e.2 Neurogénesis y sistema de memoria hipocampal.

El giro dentado no participa por igual en todas las funciones de la memoria (Morris 2006). De hecho, cuando se lesiona el giro dentado se alteran varios tipos de memoria: la memoria de codificación de las referencias espaciales (Nakayama y Sawada 2002, Nanry *et al.* 1989), recuperación de las referencias espaciales (Nanry *et al.* 1989) y memoria de trabajo (Xavier *et al.* 1999), sin embargo otras funciones parecen conservadas, como algunas tareas relacionadas con el espacio y aquellas que asocian el olor con la localización del objeto (Gilbert y Kesner 2003). Además, considerando que el porcentaje de la neurogénesis en el GD es aproximadamente de un 10%, no resulta fácil predecir hasta que

punto este puede o no influir en la memoria normal (Snyder *et al.* 2001). Hasta ahora memoria y neurogénesis se han relacionado dos formas diferentes: 1) La tasa de neurogénesis condiciona la capacidad de aprendizaje y la memoria 2) el aprendizaje aumenta la neurogénesis aumentando la supervivencia de las neuronas recién formadas.

Con respecto a la primera afirmación, existen tres tipos de evidencias que la apoyan: 1) aquellos factores que aumentan la neurogénesis también aumentan la capacidad de aprendizaje 2) los factores que disminuyen la neurogénesis disminuyen la capacidad de aprendizaje 3) existe una correlación cuantitativa entre neurogénesis y capacidad de aprendizaje. La exposición de los ratones a un ambiente rico o el aumento del ejercicio en la rueda aumentan la memoria y el número de neuronas en el giro dentado (Kempermann *et al.* 1997, Kempermann *et al.* 1998, van Praag *et al.* 1999). Por otro lado, la extirpación quirúrgica del bulbo olfatorio o la exposición a plomo induce en los ratones déficit de memoria y reducción de la neurogénesis (Jaako-Movits y Zharkovsky 2005, Jaako-Movits *et al.* 2006). Por último, en las ratas de edad avanzada algunos autores han encontrado una correlación entre la capacidad de aprendizaje y el número de nuevas neuronas (Drapeau *et al.* 2003). Sin embargo, otros estudios no han conseguido reproducirla (Bizon y Gallagher 2003, Merrill *et al.* 2003).

Con respecto a la segunda afirmación el aprendizaje ejerce una influencia compleja que afecta a todos los niveles de la neurogénesis: supervivencia celular, proliferación y muerte celular. Cuando se somete a aprendizaje a los animales se encuentra un aumento de la neurogénesis que persiste durante al menos un mes y que se correlaciona no tanto con el entrenamiento como con la habilidad cognitiva adquirida (Leuner *et al.* 2004). El aprendizaje espacial también parece aumentar la proliferación de los precursores neurales (Lemaire *et al.* 2000, Dobrossy *et al.* 2003). Este aumento de la proliferación no se correlaciona con la habilidad adquirida (Dobrossy *et al.* 2003), Esta proliferación no se encuentra en los estudios que utilizan como marcador la Ki67 (Mohapel *et al.* 2006). Sin embargo, el aprendizaje espacial también reduce el número de neuronas recién formadas (Dobrossy *et al.* 2003, Ambrogini *et al.* 2004). Esta reducción no se correlaciona ni con el

estrés ni con la actividad física. Ocurre sobre todo en la fase tardía (Dobrossy *et al.* 2003), y se correlaciona con el aprendizaje (Dobrossy *et al.* 2003). Todo ello nos impulsa a pensar que la reducción de neuronas recién formadas es un proceso importante para el propio aprendizaje. Esta reducción es debida un incremento de la muerte celular (Ambrogini *et al.* 2004). Este hecho podría explicar porque algunos estudios no encuentran modificación en el número de células en el total del periodo de entrenamiento (van Praag *et al.* 1999, Dobrossy *et al.* 2003), puesto que el aumento de la proliferación y supervivencia podrían compensarse con el aumento de la muerte celular.

III. f. Estudio de la neurogénesis in vivo

Una de las principales limitaciones a la hora de conocer el significado de la neurogénesis es la dificultad para realizar estudios in vivo. Se han utilizado en este sentido la tomografía por emisión de protones (PET), tomografía por emisión de protón único (SPECT) y resonancia magnética (RM) (Cicchetti *et al.* 2007, Chin *et al.* 2003, Arbab *et al.* 2006, Vandeputte *et al.* 2014). En general estas técnicas requieren la introducción de un radiomarcador o un marcador superparamagnético, por lo que no pueden usarse de forma repetida en el humano. Para evitar este problema se ha utilizado la RM con espectroscopia (Manganas *et al.* 2007), la RM funcional dependiente del nivel de oxigenación (BOLD-fRM) y las medidas de flujo y volumen sanguíneo cerebral (Ho *et al.* 2013). Aunque se tiene poca experiencia con estas técnicas, podría suponer un gran avance en el conocimiento de la función de la neurogénesis y su modificación en situaciones patológicas.

III.g. Neurogénesis y enfermedades neurodegenerativas

La presencia de alteraciones en la neurogénesis es una característica común de la mayor parte a las enfermedades neurodegenerativas. Además, en la mayor parte de estas enfermedades parece existir una disminución de la neurogénesis. Esto indica que en las enfermedades neurodegenerativas además de producirse una pérdida de las neuronas que existen el cerebro éste pierde su capacidad de renovarlas (Winner y Winkler 2015). Aunque estas enfermedades de generativas son manifiestamente diferentes entre sí y el patrón de pérdida neuronal también lo es, comparten sin embargo una serie de manifestaciones en las fases iniciales, como son la presencia síntomas neuropsiquiátricos y la pérdida de olfato (Hinnell *et al.* 2012, Stout *et al.* 2011). Estos síntomas podrían ser debidos a las alteraciones de la neurogénesis adulta. Además en todas ellas, en contra de lo que se pensaba inicialmente, la afectación no es exclusivamente neuronal sino también de la glía, por lo que no solo la propia neurogénesis sino también la migración de las células formadas pueden estar alteradas. En todas estas enfermedades se ha considerado la neurogénesis como una potencial diana terapéutica. En la tabla 1, se resumen las alteraciones publicadas en estas enfermedades tanto en humanos como en modelos animales.

III. g. 1. Neurogénesis adulta y enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el trastorno del movimiento más frecuente. Aunque es una enfermedad que se caracteriza fundamentalmente por la presencia de depósitos de alfa sinucleína en los cuerpos de Lewy y clásicamente se la considera como una enfermedad fundamentalmente de los ganglios de la base, las manifestaciones no motoras y la alteración del olfato son frecuentes y precoces (Tolosa *et al.* 2009). Además recientemente se ha descrito que el bulbo olfatorio se encuentra precozmente afectado en esta enfermedad (Carlesimo *et al.* 2012). La estimulación de la neurogénesis adulta en los pacientes de Parkinson como una potencial diana terapéutica (Foltynie 2015).

III.g.1.a. Estudios en humanos

Se disponen de pocos estudios *postmortem* que analicen la neurogénesis en el humano en la enfermedad de Parkinson. El estudio de la zona subventricular ha arrojado resultados dispares.. La mayor parte de los autores parecen coincidir en que hay una reducción de la neurogénesis en los estadios tardíos de la enfermedad en la SVZ (Hoglinger *et al.* 2004, van den Berge *et al.* 2011). Sin embargo, en el estudio con más pacientes (van den Berge *et al.* 2011) en el que se estudiaron 10 pacientes, 10 controles y 5 personas en las que se habían encontrado cuerpos de Lewy de forma incidental pero sin clínica no se encontró diferencia entre estos 3 grupos.

La información disponible en relación a las alteraciones del GD es todavía menor. En un estudio pequeño de 8 pacientes (5 de ellos con demencia asociada), se encontró una reducción de la neurogénesis en esta zona (Hoglinger *et al.* 2004), esta reducción era más acentuada en los 5 pacientes que asociaban demencia.

III. g. 1. b. Estudios en modelos animales

En los modelos animales de enfermedad de Parkinson con mutaciones de la alfa sinucleína se ha descrito una reducción de la neurogénesis y de la supervivencia de las neuronas recién formadas (Winner y Winkler 2015). En ellos, la sobreexpresión de alfa sinucleína se correlaciona de forma directa con la reducción de la neurogénesis en la zona del giro dentado (Winner *et al.* 2012, Schreglmann *et al.* 2015). Esta reducción, sin embargo, parece estar en relación más con una menor supervivencia de las células que con una reducción de la proliferación (Winner *et al.* 2004). Se observa también una reducción de las dendritas de las neuronas recién formadas, lo que puede tener que ver con una reducción de la actividad presináptica. En los diferentes modelos se constata que a mayor afectación neuropatológica mayor reducción de la neurogénesis (Winner *et al.* 2011, Winner *et al.* 2004, Winner *et al.* 2012, Winner *et al.* 2008, Winner y Winkler 2015).

Cuando se consideran los animales transgénicos para LRKK2 (cinasa de repetición rica en leucina 2), hay una reducción de la proliferación de las células neurales y de la supervivencia de las neuronas recién formadas (Melrose *et al.* 2007). Estos efectos son tan marcados que parece que la alfa sinucleína y LRKK2 juegan un papel fundamental en la neurogénesis y la afectación de la neurogénesis probablemente juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Con respecto al modelo de animal tóxico por MPTP (1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina) también se ha encontrado una reducción de la neurogénesis en la zona subventricular (He *et al.* 2006).

III.g.2. Neurogénesis y enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la causa de demencia más frecuente. Entre sus síntomas iniciales se encuentran la pérdida de olfato, las alteraciones del comportamiento que preceden a las alteraciones cognitivas. Los marcadores histológicos de la enfermedad son los ovillos neurofibrilares y las placas de amiloide. Se han encontrado mutaciones en los casos familiares en los genes APP (proteína precursora de amiloide), presenilina (PSEN) 1 y presenilina 2, que han permitido realizar modelos animales. Uno de los modelos animales más utilizados es el del triple mutante que sobreexpresa la variante sueca de la APP mutante, de la tau y de la presenilina, porque desarrolla alteraciones clínicas, ovillos neurofibrilares y depósitos de amiloide (Crews *et al.* 2010b).

III. g. 2. a. Estudios en el humano

Los estudios de neurogénesis en la enfermedad de Alzheimer en humanos son sumamente contradictorios, algunos encuentran incremento en la neurogénesis del giro dentado mientras que otros encuentran reducción de la misma con gliosis (Crews *et al.* 2010a, Boekhoorn *et al.* 2006). Algunos autores interpretan estos resultados como que en

diferentes estadios de la enfermedad existen diferentes alteraciones de la neurogénesis, de forma que en los estadios iniciales habría un aumento de la neurogénesis y una reducción en los estadios finales (Bossers *et al.* 2010, Gomez-Nicola *et al.* 2014).

La zona subventricular ha sido menos estudiada en la enfermedad de Alzheimer en humanos pero en un estudio realizado por Ziabreva y colaboradores se encontró una reducción de la neurogénesis con respecto a los controles (Ziabreva *et al.* 2006).

III. g 2. b. Neurogénesis en los modelos experimentales de enfermedad de Alzheimer

De nuevo cuando se estudia la neurogénesis en los modelos animales de Alzheimer existe una enorme variabilidad dependiendo del modelo, el grado de expresión de las diferentes proteínas, el momento de la enfermedad, la edad del animal, etc. (van Tijn *et al.* 2011). De forma que encontramos estudios que muestran tanto aumento como decremento de la neurogénesis, aunque la mayor parte de ellos encuentran un decremento (Kuhn *et al.* 2007, Lazarov y Marr 2010, Moon *et al.* 2014). Incluso se observa que cuando se estudia el mutante único de la APP existe una reducción de la neurogénesis (Donovan *et al.* 2006) pero en los dobles y triples mutantes aparece un aumento de la misma y de la supervivencia de las células que se producen (Haughey *et al.* 2002, Mirochnic *et al.* 2009). En un estudio que usaba el triple transgénico (APP, PSEN1 y tau) se encontró una reducción de la proliferación que se correlacionaba con la presencia de las placas de β -amiloide (Rodriguez *et al.* 2008); este mismo grupo encontró hallazgos similares en estos animales en la SVZ (Rodriguez *et al.* 2009).

Cuando se cultivan células neurales pluripotenciales no mutantes con microglía mutada para la *PSEN1* se produce una menor proliferación y supervivencia de las células neurales, lo que recalca la importancia de las células de extirpe glial en el desarrollo de la neurogénesis (Choi *et al.* 2008).

III. g. 3. Neurogénesis en el adulto y enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es una enfermedad autosómica dominante hipercinética debida a una expansión patológica del triplete GAC en el gen de la huntingtina (Pringsheim *et al.* 2012). Son característicos de ella los trastornos del comportamiento y del olfato que preceden en años a los síntomas motores de la enfermedad (Stout *et al.* 2011). La huntingtina parece ser necesaria para la neurogénesis durante el desarrollo embrionario, pero su papel en la neurogénesis adulta no está tan claro (Haremake *et al.* 2015).

III. g. 3. a. Neurogénesis en la enfermedad de Huntington, estudios en el humano

En el humano con enfermedad de Huntington se ha encontrado un aumento de la proliferación de la zona subventricular (Curtis *et al.* 2003). Este incremento es directamente proporcional al tamaño de la expansión del triplete y por ende a la severidad de la enfermedad. Sin embargo, cuando este mismo grupo estudio la zona hipocampal no encontró diferencias significativas con respecto a los controles (Low *et al.* 2011).

Se han descrito células PCNA/B-III tubulina (células proliferativas) cerca del neoestriado, lo que podría indicar que estas células migran al estriado dañado (Curtis *et al.* 2005). Pero la mayor parte de estas células que migran no son capaces de integrarse en el estriado. Las que lo hacen se convierten en interneuronas y no en células espinosas que se afectan de forma más importante en la enfermedad de Huntington (Ernst *et al.* 2014).

III. g. 3. b. Neurogénesis en la enfermedad de Huntington, estudios en el modelo animal

Los modelos animales más utilizados en la enfermedad de Huntington son el R6/1 y R6/2 que portan la expansión en el gen humano de la huntingtina y desarrollan un fenotipo muy similar al de la enfermedad humana (Mangiarini *et al.* 1996). A diferencia de lo observado en el humano, la mayor parte de los estudios en animales muestran una reducción de la neurogénesis adulta en la zona del giro dentado. Esto ocurre tanto para el modelo más lentamente progresivo R6/1 (Lazic *et al.* 2004, Lazic *et al.* 2006) como para el más rápidamente progresivo R6/2 (Phillips *et al.* 2005, Gil *et al.* 2005). Sin embargo, la diferenciación no parece estar comprometida, aunque muchos estudios encuentran una reducción del número de neuroblastos y neuronas inmaduras (Fedele *et al.* 2011).

Cuando se estudia la neurogénesis en la SVZ del modelo rápidamente progresivo R6/2 se observa una reducción de la misma a diferencia de lo encontrado en el humano (Phillips *et al.* 2005, Kohl *et al.* 2010). Así se observa una reducción de las nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, predominantemente de las dopaminérgicas (Kohl *et al.* 2010).

Cuando se sobreexpresa BDNF y *Noggin* en la pared ventricular de estos modelos ratones se produce un aumento del número de nuevas neuronas en el estriado. Estas neuronas producen prolongaciones que llegan hasta el globo pálido ipsilateral, lo que parece indicar que son capaces de integrarse y ser funcionalmente activas y que, probablemente, un cambio en el microambiente de los nichos neurogénicos es el factor más importante para la supervivencia y funcionalidad de las neuronas recién formadas (Cho *et al.* 2007).

En otros modelos murinos de enfermedad de Huntington, como los YACS46 y YACS72 que expresan la expansión completa humana en un cromosoma artificial de

levadura se observa también una reducción de la neurogénesis en el giro dentado (Simpson *et al.* 2011). Existe además un modelo de rata con una expansión de 52 tripletes que es clínicamente el más parecido a la enfermedad humana. En este modelo se observa una reducción de la neurogénesis de la zona del giro dentado que se correlaciona con un aumento del conjunto de células quiescentes (Kandasamy *et al.* 2010).

Tabla 1: Resumen de las alteraciones de la neurogénesis en las enfermedades neurodegenerativas

	SVZ		Hipocampo	
	Humanos	Animales	Humanos	Animales
Enfermedad de Parkinson	↓ Van der Berge et al 2011	↓ He et al 2006	↓ Hoglinger et al, 2004	↓ Winner et al, 2012
Enfermedad de Alzheimer	↓ Ziabreva et al, 2006	↓ Haughey et al, 2002 ↓ Rodriguez et al, 2009	↓ Crews et al, 2010 ↑ Boekhoorn et al, 2006 Depende del estadio: Bossers et al, 2010	↓ Donovan et al, 2006 ↓ Varvel et al, 2009 ↓ Crews et al, 2010 ↓ Moon et al, 2014 ↑ Mirochnic et al, 2009
Corea de Huntington	↑ Curtis et al, 2003	↓ Phillips et al, 2005 ↓ Kohl et al, 2010	+/- Low et al, 2011	↓ Lazic et al, 2004 y 2006 ↓ Gil et al, 2005 ↓ Kandansamy et al, 2010 ↓ Fedele et al, 2011 ↓ Simpson et al, 2011

III. h. La esclerosis lateral amiotrófica

III. h. 1. Conceptos generales

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva que afecta predominantemente a las neuronas motoras de córtex y asta anterior medular (Rowland y Shneider 2001). Fue descrita por Charcot en 1869 (Rowland 2001). La enfermedad se caracteriza por una debilidad progresiva que generalmente se extiende por contigüidad y que puede iniciarse por una extremidad (ELA de inicio espinal), por síntomas bulbares -disartria o disfagia- (ELA de inicio bulbar) o más raramente por insuficiencia respiratoria (ELA de inicio respiratorio) (imagen 4). No tiene un tratamiento curativo en el momento actual y su supervivencia media es de 3 a 5 años (Rowland y Shneider 2001). Se considera una enfermedad rara, con una incidencia de 1-4 por 100.000 hab./año y una prevalencia de 1 por 20.000 hab. (Matias-Guiu *et al.* 2007). Desde el punto de vista pronóstico existen pocos factores que se hayan relacionado claramente con una peor supervivencia uno de ellos es el inicio bulbar, la mayor edad al inicio, la presencia de alteraciones cognitivas y el menor tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico (Chio *et al.* 2009). Aproximadamente un 10% de los pacientes sobreviven más de 10 años algunos de estos pacientes son ELAs familiares ligadas a mutaciones concretas, pero de otros no se conocen las características concretas que condicionan esta evolución (Pupillo *et al.* 2014).

La ELA es una enfermedad generalmente esporádica, solo un 10% de los casos se consideran familiares (Valdmanis y Rouleau 2008). La primera mutación descrita fue la de la superóxido dismutasa *SOD1*. Durante años esta mutación fue considerada la más frecuente (Rosen *et al.* 1993). Gracias a ella se diseñó el primer modelo transgénico y se realizaron la mayor parte de los estudios sobre la fisiopatología de la enfermedad (Gurney *et al.* 1994). Pero progresivamente se han ido describiendo una gran cantidad de genes implicados en la enfermedad (Valdmanis y Rouleau 2008). De hecho, en los últimos años

se ha visto que la expansión en el cromosoma 9 supone casi un 30% de los casos de ELA familiar y un 10% de los casos de ELA esporádica, y es por tanto la mutación más frecuente en la ELA familiar y en la esporádica (Garcia-Redondo *et al.* 2013). Además se sabe que en muchos casos no es suficiente con tener una mutación para presentar la enfermedad, se necesita además la suma de un factor externo o de una segunda mutación (Peters *et al.* 2015, He *et al.* 2014).

Por otro lado el estudio de los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad nos ha permitido estudiar mecanismos que son importantes para el desarrollo de la misma como el metabolismo del RNA o el transporte axonal (Peters *et al.* 2015). Además algunos de los genes encontrados son genes que se relacionan con la demencia frontotemporal, lo que junto con la presencia de inclusiones TDP-43 (proteína transactiva de respuesta de unión al ADN) fosforiladas en el citoplasma de las neuronas de estos pacientes permitió relacionar ambas enfermedades (Ferrari *et al.* 2011).

De hecho, contra lo que se pensaba inicialmente la esclerosis lateral amiotrófica no es una enfermedad exclusiva de las neuronas motoras. Afecta a otras células a nivel microscópico (Boillee *et al.* 2006), particularmente se han implicado la glía y la microglía e igualmente afecta otras áreas del cerebro, fundamentalmente aquellas implicadas en la cognición (Carlier *et al.* 2015). Las alteraciones cognitivas en la ELA son relativamente frecuentes, aunque dado la importancia de los déficit motores y del habla en muchas ocasiones pasan desapercibidas. En la mayor parte de los casos, estas alteraciones son leves. Así hasta un 30% de los pacientes existen alteraciones disejecutivas, apatía y trastornos de la inteligencia social (Ceramini *et al.* 2014, Goldstein y Abrahams 2013, Raaphorst *et al.* 2015, Kasper *et al.* 2015, Radakovic *et al.* 2015). La presencia de demencia establecida es menos frecuente y afecta aproximadamente a un 10% de los pacientes con ELA (Beeldman *et al.* 2015). Cuando la demencia está presente suele cumplir criterios de demencia frontotemporal (DFT) (Ferrari *et al.* 2011). En los casos en los que existe una demencia asociada, esta suele ser la manifestación de inicio y la afectación motora suele ser más tardía, aunque también puede ocurrir en pacientes en que

las manifestaciones motoras son las iniciales (Hsieh *et al.* 2015). La presencia de alteraciones cognitivas constituye un factor de mal pronóstico que dificulta además de forma considerable la toma de decisiones en la enfermedad (Chio *et al.* 2009).

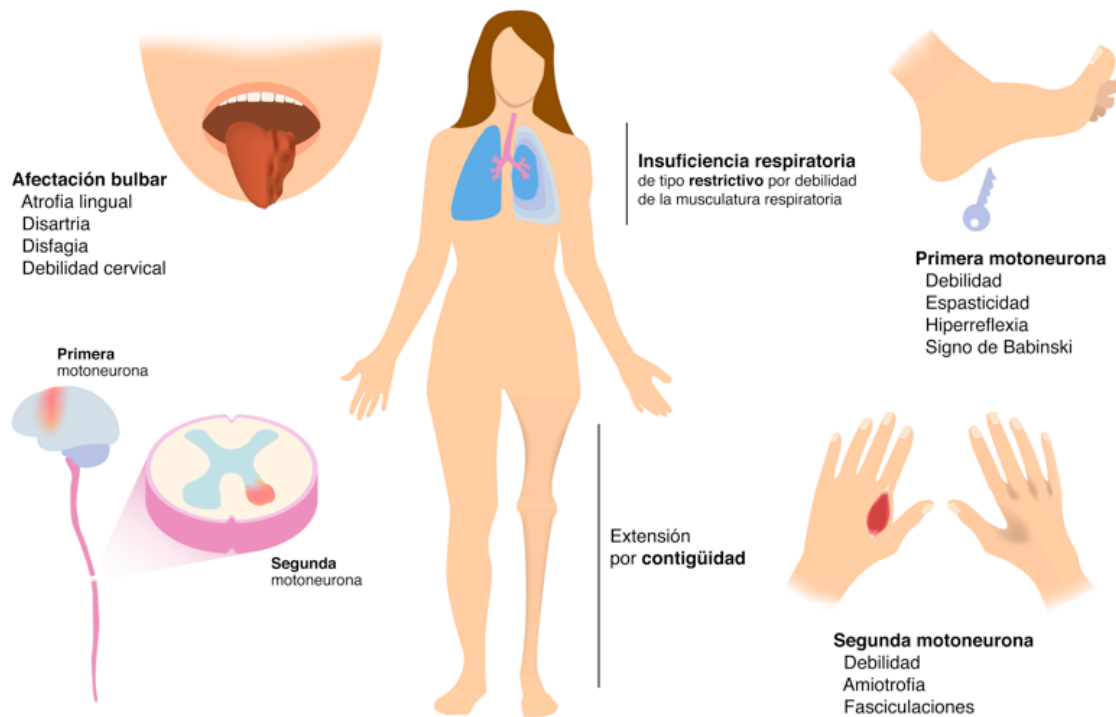


Imagen 4: Clínica de la esclerosis lateral amiotrófica. Se observan las alteraciones clínicas características de la esclerosis lateral amiotrófica y su sustrato anatómico.

I.h.2. Patología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

La primera descripción de la ELA, realizada por Charcot, precisamente relacionaba la patología observada en las autopsias con los síntomas clínicos (Rowland 2001). Desde un punto de vista macroscópico se encuentra una pérdida de volumen en el surco prefrontal del córtex, en el asta anterior medular y en las raíces anteriores. Desde el punto de vista microscópico, existe una pérdida de neuronas en esas mismas localizaciones con gliosis precoz. Puede existir degeneración walleriana (Ravits *et al.* 2013). Es característica la presencia de las inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas que colocalizan con la periferina, previamente conocidas como cuerpos de Bunina (Mizuno *et al.* 2011).

Recientemente, se ha descrito la presencia de inclusiones citoplasmáticas con TDP43 fosforilada, que previamente se habían encontrado en casos de demencia frontotemporal. Están presentes en prácticamente todos los casos de ELA (no se encuentran en la mayor parte de los casos ligados a la *SOD1* y a la *FUS*) (Mackenzie *et al.* 2007). La importancia exacta de la presencia de la TDP43 citoplasmática en la ELA se desconoce. Aunque algunos consideran que tiene un papel directo en su fisiopatogenia, en el transporte nucleo-citoplásmico, en el transporte endoplásmico y en la transmisión pseudopiónica célula a célula (Highley *et al.* 2014).

Como correlato a la parte clínica se han encontrado en las necropsias de pacientes con ELA alteraciones que afectan a áreas no puramente motoras como la zona frontal o el hipocampo (Takeda *et al.* 2009). Las alteraciones encontradas en el hipocampo se localizaban fundamentalmente en giro dentado y ocurrían sobre todo en pacientes con quejas de memoria.

III. h. 3. Etiopatogenia

La etiopatogenia de la ELA es desconocida. Se han implicado en ella una gran cantidad de factores (imagen 5). Basados en los estudios del modelo transgénico para la *SOD* se relacionó la enfermedad con el estrés oxidativo (Costa *et al.* 2010). Aunque estudios recientes con células procedentes de pacientes con ELA esporádica también apuntan a alteraciones mitocondriales como causa de la neurodegeneración (Alves *et al.* 2015). Posteriormente se han implicado otros factores como la toxicidad por el glutamato (Blasco *et al.* 2014), el metabolismo del RNA (Peters *et al.* 2015, Droppelmann *et al.* 2014, Emde *et al.* 2015), el transporte axonal (Bilsland *et al.* 2010), el incremento de la autofagia (Fornai *et al.* 2008, Navone *et al.* 2015), modificaciones en el transporte núcleocitoplásmico (Zhang *et al.* 2015), modificaciones en el transporte endoplásmico (Soo *et al.* 2015), del transporte entre el citoplasma y el Golgi (Soo *et al.* 2015) y el acumulo de proteínas (Peters *et al.* 2015, Rothstein 2009).

No se conoce si el tipo de muerte celular que sufren las neuronas es una apoptosis, una necrosis o una mezcla de ambas, necroptosis (Wood y Langford 2014, Re *et al.* 2014, Frakes *et al.* 2014). Incluso, si esta muerte celular de las neuronas podría estar comandada desde los astrocitos (Pirooznia *et al.* 2014). En los últimos años se le ha dado gran importancia a la propagación de la enfermedad (Ravits y La Spada 2009), se han evocado diferentes factores como un factor existente en el líquido cefalorraquídeo (Matias-Guiu *et al.* 2010), exosomas (Basso *et al.* 2013) o una propagación celular de proteínas priónicas (Grad *et al.* 2015). En este sentido, parece existir también una propagación de las alteraciones que condicionan las inclusiones TDP43 llegando a realizarse una estadificación según la localización de las lesiones (Kassubek *et al.* 2014, Brettschneider *et al.* 2013). A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, hasta el momento no se ha relacionado la neurogénesis como un factor potencial en la etiopatogenia de la ELA (Abdipranoto *et al.* 2008).

La etiopatogenia de la ELA se han estudiado basándose fundamentalmente en dos herramientas: los estudios genéticos y los modelos animales (Swarup y Julien 2010, Liscic *et al.* 2008). Los estudios a partir de necropsias son escasos al igual que los estudios *in vivo* (McMillan *et al.* 2015, Brettschneider *et al.* 2013, Kassubek *et al.* 2014).

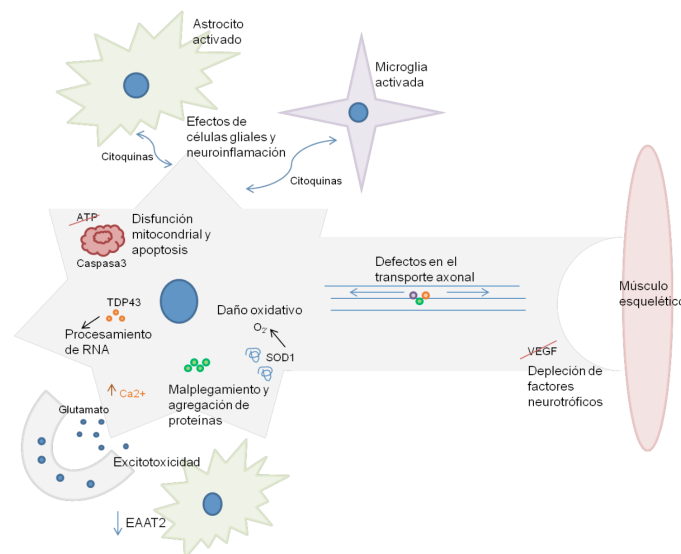


Imagen 5: Etiopatogenia de la ELA. Se observan las posibles vías implicadas en la etiopatogenia de la ELA. Imagen procedente de la tesis doctoral de la Dra. Valencia 2013 (reproducción autorizada).

III. h. 4. Modelos experimentales en la ELA

Al igual que en otras enfermedades en la ELA se ha intentado buscar uno o varios modelos experimentales (Galan *et al.* 2007). Un modelo experimental adecuado puede ayudar a conocer mejor la fisiopatología de la enfermedad y la forma en que esta se propaga y, por otro lado, nos ayuda a probar diferentes fármacos o tratamientos para la misma. El modelo mas ampliamente usado en la historia de la enfermedad es el ratón transgénico para mutaciones humanas en la *SOD1* (Gurney *et al.* 1994). Este modelo ha permitido un importantísimo avance en el mundo de la ELA. Presenta unas manifestaciones clínicas muy similares a las de la enfermedad humana, aunque, el inicio suele ser cervical. La rapidez en que progresa la enfermedad depende de la mutación que se haya introducido en el ratón (Galan *et al.* 2007). Por tener una rapidez intermedia la mutación más utilizada es mutación humana G93A (Galan *et al.* 2007). Existe también un modelo de rata transgénica para la SOD que, por su mayor tamaño, es más adecuado para realizar intervenciones quirúrgicas (Matsumoto *et al.* 2006).

A pesar de que este modelo ha sido el principal en la historia de la ELA, en los últimos años el modelo se encuentra bajo sospecha (Perrin 2014). Esto se debe a es que es el modelo utilizado para la selección de los fármacos que posteriormente se ensayan en humanos. En las ultimas décadas se han ensayado mas de 50 moléculas y ninguna de ellas han mostrado eficacia incluso alguna empeoraba la evolución de la enfermedad (Goutman y Feldman 2015). Otro motivo es la ausencia de inclusiones citoplasmáticas de TDP43 fosforiladas en la ELA ligada a la *SOD1*, lo que (junto con la ELA ligada a mutaciones en la *FUS*) la diferencia de los demás casos de ELA (Mackenzie *et al.* 2007). Además, aunque desde el punto de vista motor es muy similar a la forma esporádica, el modelo de ratón ligado a la *SOD1* no presenta alteraciones de comportamiento ni cognitivas lo que lo diferencia clínicamente de las otras formas de ELA.

Por esto y desde entonces la búsqueda de un nuevo modelo experimental que represente a la enfermedad tanto desde el punto de vista clínico como desde el punto de vista neuropatológico se ha convertido en una prioridad. Con el descubrimiento de las

nuevas mutaciones, el primer intento ha sido realizar ratones transgénicos para las mismas. Inicialmente se tenía especial esperanza en el ratón transgénico para la TDP-43 puesto que esta parece ser un denominador común para la mayor parte de las formas de ELA. Sin embargo, los modelos transgénicos para mutaciones en este gen a pesar de mostrar lesiones muy similares a las del humano desde el punto de vista histológico, no presentan las características clínicas de la enfermedad o bien la tasa de progresión es tan rápida que no sirven como buenos modelos para la misma (Zhou *et al.* 2010).

Por la frecuencia de la expansión en el cromosoma 9 se ha intentando modelar también la enfermedad utilizando esta expansión. Tras el paso por el modelo celular (Almeida *et al.* 2013) y el modelo de pez cebra (Ciura *et al.* 2013), muy recientemente se ha conseguido obtener un modelo murino (Chew *et al.* 2015). Desgraciadamente aunque este modelo presenta las lesiones histológicas con inclusiones TDP-43 positivas, desde un punto de vista clínico apenas presenta alteraciones en el comportamiento pero no alteraciones motoras (Chew *et al.* 2015).

Probablemente, el avance mas importante desde el punto de vista de los modelos en la ELA ha sido la posibilidad de desarrollar a partir de células pluripotenciales de pacientes neuronas que desarrollan las lesiones histológicas de la ELA (Richard y Maragakis 2015). Estos modelos suponen una gran ayuda para la selección de fármacos para ensayos clínicos (Egawa *et al.* 2012).

III. h. 5. Tratamiento

No existe un tratamiento curativo para la ELA. Su tratamiento se basa en dos pilares: el tratamiento etiopatogénico y el tratamiento sintomático. En lo que respecta al tratamiento etiopatogénico existe un único fármaco aprobado para la ELA el riluzol (Andersen *et al.* 2007). El riluzol es un fármaco que se ensayo en humanos antes que en el modelo SOD. Su supuesto mecanismo de acción es reducir la citotoxicidad por glutamato (Bogaert *et al.* 2010). Sin embargo, el uso de otros fármacos mas potentes que actúan sobre la misma diana terapéutica, como la memantina, no ha mostrado ninguna utilidad en la ELA (Levine *et al.* 2010, de Carvalho *et al.* 2010). Por ello, se buscan otros potenciales

mecanismos de acción que expliquen el efecto del riluzol (Bellingham 2011). En lo que se refiere a su eficacia, el riluzol ha demostrado apenas un discreto aumento de la supervivencia (alrededor de los 3 meses) sin mejoría de la calidad de vida (Miller *et al.* 2007). Aunque su eficacia es discreta, el fármaco se encuentra aprobado para esta indicación y se utiliza en todos los pacientes no terminales en Europa, donde se cubre por el seguro, y para muchos de ellos en Estados Unidos, donde tiene que financiarse por el propio paciente. En gran parte de los ensayos clínicos, sobre todo en los que se realizan en Europa, el tratamiento con riluzol forma parte de los criterios de inclusión. Algunos investigadores han apuntado que el riluzol pudiera actuar como un modificador negativo de la acción del fármaco testado (Cudkowicz *et al.* 2010). En este sentido, en nuestro grupo se realizó una investigación en un modelo celular en el que cuando se administraba riluzol conjuntamente a fármacos neuroprotectores, como el resveratrol, el efecto neuroprotector desaparecía (Yanez *et al.* 2011).

A pesar de que se han realizado ensayos clínicos con más de 50 fármacos diferentes no se ha encontrado otro tratamiento etiopatogénico. Esto ha hecho que en estos momentos el tema de los ensayos clínicos en la ELA esté sometido a una importante controversia (Mitsumoto *et al.* 2014, DeLoach *et al.* 2015). Dentro de los posibles tratamientos se ha considerado el uso de células madre (Martinez *et al.* 2009, Haidet-Phillips y Maragakis 2015, Sharma *et al.* 2015, Oh *et al.* 2015). Sin embargo, esta terapéutica se encuentran en fases muy precoces. En humanos solo se han realizado estudios de seguridad (Badayan y Cudkowicz 2008, Goutman *et al.* 2015). Se desconoce por tanto cuáles serían las células ideales, la cantidad y la vía por la que deberían administrarse (Coatti *et al.* 2015, Thomsen *et al.* 2014). Parece claro que el papel de estas células no sería tanto reparador sino inductor de un ambiente más favorable para las neuronas motoras (Matias-Guiu *et al.* 2008, Galan *et al.* 2010, Mazzini *et al.* 2012, Hajivalili *et al.* 2015).

Con respecto a los tratamientos sintomáticos de la enfermedad, algunos de ellos como la ventilación mecánica no invasiva consiguen aumentar la supervivencia y la

calidad de vida de los pacientes (Radunovic *et al.* 2013). El otro tratamiento que ha demostrado su eficacia en ensayo clínico es una combinación de quinidina y dextrometorfano para el tratamiento de la labilidad emocional (Miller *et al.* 2009). En los últimos años, la mayor parte de los centros han formado equipos de atención multidisciplinar para los pacientes con ELA. El ser remitido a estas unidades ha demostrado conseguir una mayor rapidez en el diagnóstico y una mejora de la supervivencia de los pacientes y de su calidad de vida (Rooney *et al.* 2015).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad grave, neurodegenerativa de etiopatogenia desconocida (Mitchell y Borasio 2007). Sea o no por este desconocimiento de su etiopatogenia lo cierto es que no existe un tratamiento curativo para ella en el momento actual (Miller *et al.* 2009). En los últimos años la idea de que la esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad exclusiva de las neuronas motoras ha desaparecido. Así la presencia de alteraciones cognitivas leves, alteraciones del comportamiento o cambios de carácter, alteraciones de la inteligencia social y de la empatía están presentes en mas del 30 por ciento de los pacientes, y pueden aparecer en estadios relativamente recientes de la misma (Goldstein y Abrahams 2013). Aproximadamente en un 10% de los casos puede existir una demencia real que suele ser de tipo frontotemporal. De hecho, muchos autores consideran que la demencia frontotemporal y la ELA son dos manifestaciones en el espectro de la misma enfermedad (Ferrari *et al.* 2011). E incluso algunos autores la relacionan con la enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.* 2014b). Es más, dado su carácter rápidamente progresivo hay quien ha considerado la ELA como un modelo para otras enfermedades neurodegenerativas. O bien que podría haber una causa común para todas ellas que se modifica por la presencia o ausencia de factores externos (Turner y Swash 2015).

En los últimos años se ha descrito la presencia de neurogénesis adulta en los humanos principalmente en el giro dentado (Yuan *et al.* 2014). Los principales nichos neurogénicos descritos son el giro dentado y la zona subventricular (Kempermann *et al.* 2015, Kuge *et al.* 2009), aunque se han descrito otras zonas que pueden actuar potencialmente como nichos neurogénicos como la sustancia nigra (Lie *et al.* 2002) y la médula espinal en la zona que rodea el canal (Hugnot y Franzen 2011).

La neurogénesis del adulto se ve modificada en situaciones patológicas (Jessberger y Gage 2014). En algunos casos ante determinadas agresiones la neurogénesis parece aumentar probablemente con un intento compensatorio, es el caso del ictus (Barkho y Zhao

2011). Existen otros casos en que la neurogénesis parece estar afectada negativamente así ocurre con las enfermedades psiquiátricas, en las que se especula que la reducción de la neurogénesis juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (Arnold *et al.* 2005). Es el caso de las enfermedades neurodegenerativas dada la presencia de síntomas precoces de alteraciones del comportamiento y del olfato también se considera que la neurogénesis pueda jugar un papel fundamental en el desarrollo de las mismas (Abdipranoto *et al.* 2008, Thompson *et al.* 2008). En la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas la neurogénesis parece encontrarse reducida (Winner y Winkler 2015). Sin embargo, existen pocos estudios en humanos y los resultados parecen ser bastante contradictorios. Además muchos de los estudios se centran en uno de los nichos neurogénicos sin evaluar el otro. Por otro lado, en algunos casos como en el de la Enfermedad de Alzheimer la neurogénesis parece comportarse de forma diferente según el estadio de la enfermedad (Galvan y Bredesen 2007). Dando un paso mas, todas estas enfermedades se caracterizan por la ausencia de un tratamiento curativo, por lo que si la neurogénesis se encuentra realmente alterada en ellas (sea de forma primaria o secundaria) podría convertirse en una diana terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas (Brinton y Wang 2006b, Crespel *et al.* 2004).

No existen estudios previos del estado de la neurogénesis adulta en pacientes con ELA. Los pocos estudios que existen se han realizado en el modelo transgénico para la *SOD1* y se han centrado en los nichos medulares, encontrando resultados divergentes -tabla 8-. (Chi *et al.* 2007, Chi *et al.* 2006, Guan *et al.* 2007, Liu y Martin 2006). Dado que la ELA es una enfermedad neurodegenerativa de etiopatogenia desconocida y sin tratamiento curativo, estudiar si la neurogénesis se encuentra o no alterada, es de vital importancia para comprender mejor la enfermedad y diseñar estrategias terapéuticas mas eficientes.

V. HIPÓTESIS

Dado que la neurogénesis del adulto se encuentra alterada en las enfermedades neurodegenerativas y que la esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa en la que pueden estar presentes síntomas que se asocian a las alteraciones de la neurogénesis (cambios de carácter, alteraciones en el olfato), podría ocurrir que la neurogénesis estuviera alterada en los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica.

VI. OBJETIVOS

1. Describir el estado de la neurogénesis del adulto en necropsias procedentes de pacientes con ELA para verificar nuestra hipótesis, analizando para ello ambos nichos: subventricular y giro dentado.
2. Si hay una modificación en la neurogénesis, determinar en que estadio o estadios se produce para cada uno de los nichos neurogénicos, y si afecta o no a la estructura de los nichos.
3. Si hay una modificación en la neurogénesis, determinar si existe una correlación el fenotipo de los pacientes (incluyendo clínica y neuroimagen) con la alteración de la misma.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII. a. Pacientes

Entre enero del 2006 y julio del 2007 se ofreció a todos los familiares de pacientes con ELA fallecidos en el hospital que cumplieran criterios de ELA probable o definida según criterios de El Escorial revisado (Brooks *et al.* 2000) la posibilidad de donar su encéfalo para participar en el estudio. Del total de pacientes fallecidos en nuestro hospital en ese período, nueve pacientes y/o sus familias aceptaron la participación. En todos los casos la necropsia se realizó sólo para la donación de los tejidos de investigación y sin motivos clínicos.

Se realizó un estudio retrospectivo de las variables clínicas de los pacientes, recogiendo para ello los datos registrados en sus historias clínicas. Se analizó la forma de inicio de la enfermedad, edad de inicio, necesidad o no de ventilación mecánica, condiciones asociadas, alteraciones cognitivas asociadas, pruebas de neuroimagen realizadas, presencia o ausencia de historia familiar, estudios genéticos realizados y presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos.

Posteriormente se realizó a los familiares una encuesta telefónica estructurada que valoraba la presencia de signos de deterioro cognitivo, historia familiar de los mismos y síntomas neuropsiquiátricos. Esta encuesta fue realizada en todos los casos con excepción de los casos 1 y 7 en que no se pudo contactar con el familiar.

Se seleccionaron 4 controles de nuestro centro que habían consentido también a la donación de sistema nervioso. Estos controles habían fallecido por causas no neurológicas. Se revisó la historia clínica de los mismos. Ninguno de ellos tenía enfermedades neurodegenerativas aunque uno (control 3) había presentado un ictus mas de 10 años antes de su fallecimiento.

VII. b. Cuestiones éticas

El estudio fue valorado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos. Para todos los casos y controles se obtuvo el consentimiento informado para la realización de la extracción de órganos y la cesión para el estudio, bien por los pacientes en vida o bien por sus familias. El estudio fue realizado conforme a las normas de buena práctica clínica (BPC).

Los datos de los pacientes se trataron según la ley de protección de datos del 13 de Diciembre de 1999 y se almacenaron en una base de datos anonimizada guardada en el sistema informático del Hospital Universitario Clínico San Carlos.

VII. c. Estudio histológico

VII. c. 1. Necropsias

La necropsia para extracción del tejido central se realizó en un tiempo que osciló entre las 2 y las 6 horas desde el fallecimiento del paciente. El paciente fue previamente conservado en cámara fría, según el procedimiento habitual establecido en el Hospital Clínico San Carlos y siguiendo el reglamento de sanidad mortuoria de la Comunidad de Madrid. Todas las necropsias se realizaron según el procedimiento estándar del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, con la excepción de que en los casos de ELA no se realizó la habitual apertura de tres cavidades, sólo se extrajo sistema nerviosa. Las necropsias se realizaron conforme a la ley 29/1980 que regula el procedimiento en España.

Se realizó con el método clásico de apertura de la cavidad craneal y corte bajo el agujero occipital tomando la parte alta de la médula cervical. Se tuvo especial cuidado en

seccionar anteriormente los nervios ópticos y los pares craneales de modo que quede parte de ellos en el encéfalo, especial cuidado en obtener intactos los bulbos y nervios olfatorios.

La medula espinal se extrajo por vía anterior con especial cuidado en obtener toda la longitud de la médula espinal desde la región cervical alta hasta la cola de caballo, tratando de preservar los ganglios raquídeos y de segmentos apropiados de raíces anteriores y posteriores.

Para el corte del encéfalo y de la medula espinal se realizó el siguiente procedimiento:

La Separación de los hemisferios cerebrales, cortando exactamente por la línea media del cuerpo calloso para prepararlo para su posterior tallado:

- El hemisferio cerebral izquierdo se fija en formol tamponado al 10% (tampón fosfato salino, 0,1 Molar, pH 7,35). El tiempo mínimo de fijación de los tejidos fue un mínimo de 15 días, con la finalidad de garantizar la penetración de del fijador.
- El hemisferio cerebral derecho se procesa para su posterior congelación.
- La médula espinal se corto en segmentos de unos 5 mm. La primera sección se fijo en formol tamponado al 10% y la inmediata siguiente se congela, y así sucesivamente.

El hemisferio destinado a técnicas histológicas e inmunohistoquímicas que seccionado en cortes coronales clásicos de 1 cm de grosor como máximo con ayuda de un cuchillo con hoja de 35 cm de longitud, para realizar cortes coronales lo mas uniformemente posibles del cerebro y se colocaron sucesivamente en una superficie plana desde el polo frontal hasta el polo occipital.

El destinado para técnicas bioquímicas, genéticas, moleculares, etc., fue cortado de igual forma, en cortes de 1 cm, congelado sobre una placa enfriada sobre nieve carbónica. Los bloques se guardan en bolsas de plástico herméticas para su almacenamiento inmediato y continuo a -80°C.

Solo en dos casos ambos hemisferios se conservaron en formaldeído al 10% tamponado con PBS, fueron los pacientes 1 y 4.

El análisis del sistema nervioso incluyó peso del encéfalo, análisis morfológico macroscópico del encéfalo y la medula (cuando los pacientes la habían donado) y estudio microscópico de ambas estructuras, cuando éstas estaban disponibles, con las técnicas habituales. Esto incluyó en todos los casos estudio de hematoxilina-eosina y técnica de Nissl. A criterio del patólogo se utilizaron otras técnicas adicionales como rojo congo, técnica de tioflavina y técnicas argénticas.

VII. c. 2. Estudio inmunohistoquímico

Se realizó también un estudio inmunohistoquímico para el diagnóstico de la enfermedad que incluyó las tinciones para periferina, ubiquitina y TDP-43. Los anticuerpos utilizados se incluyen en la tabla 2.

El estudio de la neurogénesis se realizó en los tejidos procedentes de los pacientes y controles secciones que incluían: SVZ e hipocampo. La metodología empleada para la inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y estudio de microscopía electrónica es la utilizada por Marti-Fabregas y colaboradores en el 2010 (Marti-Fabregas *et al.* 2010).

Todos los tejidos fueron incluidos en parafina siguiendo los protocolos establecidos por el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Se realizaron cortes de 6 μm en el microtomo (Leica) que posteriormente se lavaron de forma concienzuda con PBS 0.1 M.

Las secciones de tejido fueron incubadas durante una hora en una solución bloqueadora (PBS, 0,2%, Triton, 10% suero de cabra normal) y posteriormente incubados

durante 24 horas en los anticuerpos primarios (tabla 2) diluidos en PBS. Tras la incubación con anticuerpos primarios, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con los anticuerpos secundarios (tabla 2), tras lo que se visualizaron utilizando una solución con 0.03% de diaminobencidina y 0.01% de H2O2 para conseguir un producto reactivo teñido de marrón y su posterior contraste con tinción de Nissl para su posterior montaje con DPX y su visualización en un microscopio Zeiss.

VII. c. 2. a. Inmunofluorescencia

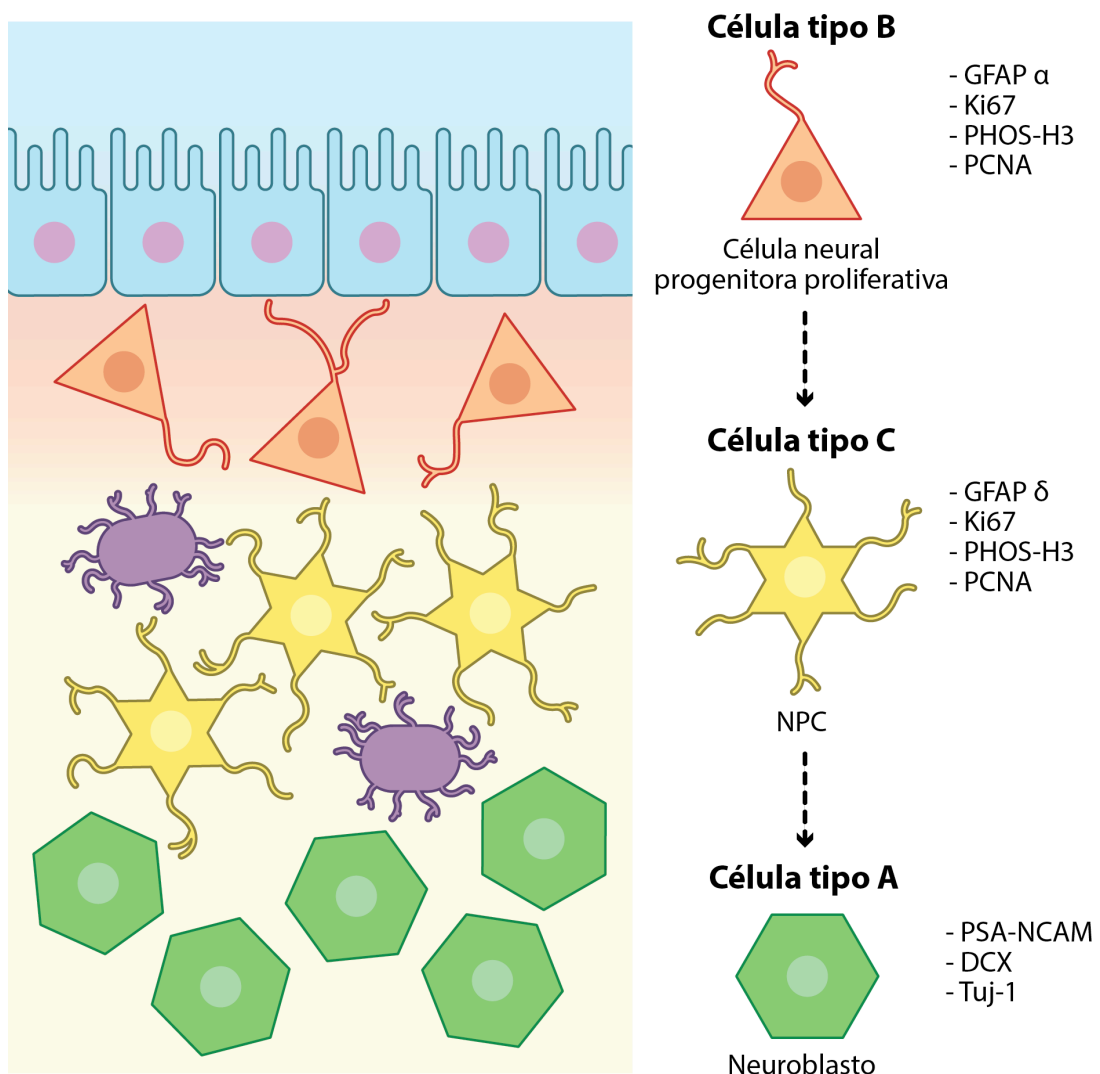


Imagen 6: Anticuerpos en las distintas fases celulares de la neurogénesis en la SVZ. El dibujo muestra los anticuerpos utilizados para marcar cada una de las fases celulares de la neurogénesis.

Para revelar el antígeno Ki-67 se calentó el tejido en un tampón 10 mM de citrato de sodio a un pH de 6. Las secciones de tejido fueron incubadas durante una hora en una solución bloqueadora (PBS, 0,2 %, Triton 10%, suero de cabra normal) y posteriormente incubadas durante 24 horas con los anticuerpos primarios (tabla 2) diluidas con PBS. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas con PBS y después incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 2).

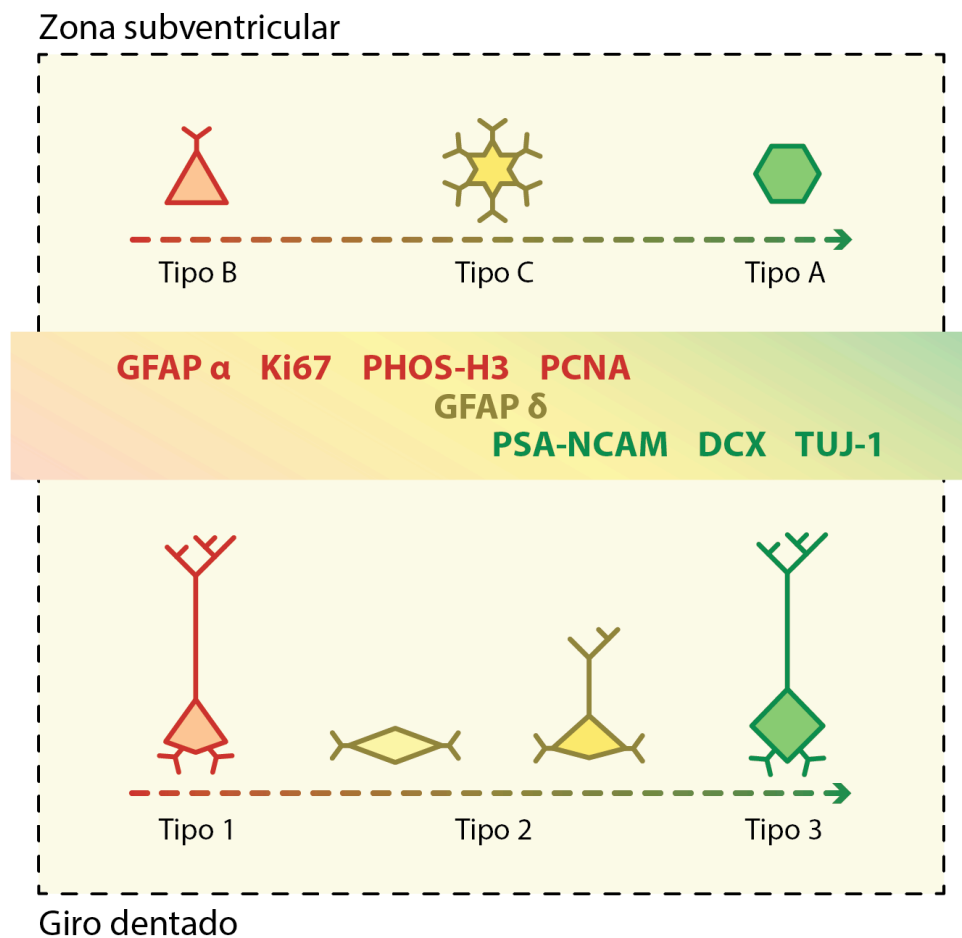


Imagen 7: Un mismo anticuerpo puede marcar más de una fase celular en la neurogénesis. Se observa que los marcadores utilizados para los distintos tipos celulares pueden marcar células en la transición de varias fases.

Para el estudio inmunohistoquímico de inmunofluorescencia de los otros marcadores tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones de tejido fueron lavadas concienzudamente y después incubadas con el anticuerpo apropiado Alexa-Fluor durante 24 horas. Después de un lavado intensivo las secciones fueron montadas en un reactivo ProLong Oro con DAPI (Molecular Probes, Invitrogen).

Para el análisis cuantitativo se analizaron 10 campos diferentes para cada uno de los anticuerpos estudiados, el resultado obtenido fue la media de las 10 determinaciones. Los resultados se expresan como como células positivas para cada anticuerpo por $500\ \mu\text{m}^2$ y corresponden a la media de dichas visualizaciones en el el microscopio confocal Olympus FluoViewer 1000 o confocal Leica SP2. En aquellos casos en que se valoraban inclusiones la cuantificación no se realiza por células positivas sino por número de inclusiones positivas en campo de $500\ \mu\text{m}^2$.

VII. c. 3. Microscopía electrónica

Los tejidos fueron cortados en un vibratomo en secciones coronales de $200\ \mu\text{m}$. Posteriormente se postfijaron en una solución al 2% de osmio durante dos horas tras las cuales se lavaron, deshidrataron e incluyeron en araldita (Durcupan, Fluka). Los cortes semifinos ($1.5\ \mu\text{m}$) se tiñeron en una solución al 1% de azul de toluidina y se observaron en el microscopio para ver la organización de las zonas estudiadas (SVZ, giro dentado, zona central medular). Aquellos semifinos que se consideraron de interés se arrancaron del porta empleando nitrógeno líquido. Posteriormente se cortaron secciones ultrafinas ($70\ \text{nm}$) para microscopía electrónica. Estas se realizaron con una cuchilla de diamante y las secciones fueron contrastadas con citrato de plomo. Para dichas observaciones se utilizó un microscopio electrónico Fei Tecnai Spirit.

La medida de las diferentes estructuras arquitectónicas que componen los nichos se realizó utilizando los ultrafinos de microscopía electrónica.

Tabla 2: Anticuerpos realizados en el estudio inmunohistoquímico

Anticuerpos primarios					
Anticuerpo	Huésped	Dilución	F u e n t e / catálogo	Inmunógeno	Descripción
Ubiquitina	Conejo	1:100	Abcam/ ab7780	Proteína completa recombinante (Humana)	Reconoce específicamente los cuerpos de inclusión citoplasmáticos ubiquitinados
TDP43	Conejo	1:100	C e l l Signaling / 3449	Péptido sintético (acoplado a KLH) que corresponde a los residuos que rodean el Ala260 de la TDP43	TDP43 (TAR DNA-binding protein 43) relacionada con la regulación transcripcional del splicing de exones
PCNA	Rata	1:100	Abcam A29	Antígeno nuclear de proliferación celular	Marca la proliferación
Ki-67	Ratón	1:100	Dako/ M 7240	Péptido recombinante humano que corresponde a un fragmento cDNA Ki67 de 1002bp	Marca la proliferación celular (todas las fases del ciclo celular excepto G0)
S100	Conejo	1:1	Immunostar/ 22520	proteína S100 aislada de cerebro bovino	Marcador ependimal y glial en el sistema nervioso central
Histona 3	Conejo	1:200	C e l l Signaling / 9701	Fosfopéptido sintético (acoplado a KLH) correspondiente a residuos que rodean la Ser10 de la histona humana H3	Marcador de la proliferación celular (fase S)
P S A NCAM	Ratón	1:400	AbCys/ AbC0019 Clone 355	Meningococcus grupo B (cepa 355)	Marcador de neuroblastos en migración
Tuj1	Pollo	1:500	Millipore / AB9354	β -Tubulin de clase neuronal III	Marcador neuronal precoz
DCX	Cabra	1:500	Santa Cruz SC-8066	Proteína asociada a los microtubulos en neuroblastos	Marcador de neuroblastos
GFAP- δ	Conejo	1:500	Millipore/ AB9598	Proteína glial fibrilar acida	Marcador exclusivo de la isoforma δ de los astrocitos, No reconoce los astrocitos GFAP- α
GFAP	Conejo	1:600	Dako/ Z0334	Proteína glial fibrilar acida	Marcador de astrocitos
GFAP	Ratón	1:600	Sigma/ C9205 Clone G- A-5 Cy3	Proteína glial fibrilar acida	Marcador de astrocitos
IBA1	Cabra	1:200	Wako 019-19741	Proteína calcio dependiente codificada por el gen AIF1	Marcador de microglía y macrófagos
Anticuerpos secundarios					
Anticuerpo	Huésped	Dilución	Fuente/catálogo		
Peroxidasa anti Rabbit IgG	Cabra	1:200	Vector Labs, PI-1000		
Alexa Fluor 488 anti Chicken IgG	Cabra	1:500	Invitrogen A11039		
Alexa Fluor 555 anti Mouse IgG	Cabra	1:500	Invitrogen A21424		
Alexa Fluor 555 anti Mouse IgM	Cabra	1:500	Invitrogen A21426		
Alexa Fluor 488 anti Mouse IgG	Cabra	1:500	Invitrogen A11029		
Alexa Fluor 647 anti Rabbit IgG	Cabra	1:500	Invitrogen A21245		

VII. d. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media \pm desviación estandar. Dado el pequeño número de pacientes no fue posible realizar test paramétricos, por lo que la comparación de medias fue realizada utilizando la prueba de comparación de medias U de Mann Whitney. El criterio para la significación estadística fue $p < 0.05$. No se realizó el estudio con grupos con menos de 3 individuos. No se realizó un test multivariante por el reducido tamaño de las muestras. Se realizaron las comparaciones entre los controles y el total de pacientes con ELA, y los controles y los pacientes con ELA sin demencia para todas las variables estudiadas. Dado que el grupo de pacientes con demencia frontotemporal era de sólo 2 individuos no se realizó el análisis comparativo con este grupo.

Se realizó también el análisis comparativo entre los pacientes con ELA con y sin tratamiento con riluzol, con o sin alteraciones neuropsiquiátricas, según su sexo y con formas de inicio bulbar o espinal.

Para estudiar la presencia o ausencia de una posible correlación entre la edad y la neurogénesis, y entre la presencia de TDP-43 y la neurogénesis se utilizó el test de Pearson.

El programa utilizado para los estudios estadísticos fue Prism®. Los gráficos de los resultados fueron realizados utilizando el mismo programa Prism®.

VIII. RESULTADOS

VIII. a. Descripción de las variables clínicas en los pacientes

Las variables clínicas de los pacientes se resumen en la tabla 3.

VIII. a. 1. Forma de inicio de la enfermedad

En lo que respecta a la enfermedad de neurona motora, 5 de los 9 pacientes (55%) presentaron una forma de debut bulbar (pacientes 1, 2, 6, 7 y 8), aunque es de destacar que los pacientes 1 y 2 iniciaron su clínica por la afectación cognitiva. En el caso de la paciente 1 se inicio por un cuadro de alteración de la nominación tipo afasia primaria progresiva y solo aproximadamente 2 años después apareció la clínica de disfagia, disartria y alteración respiratoria asociada. En el caso del paciente 2 la clínica inicia por alteraciones del carácter y del comportamiento, y posteriormente alteraciones de la memoria. Aproximadamente 3-4 años después se desarrolló la clínica bulbar consistente en disfagia, disartria e insuficiencia respiratoria. Cuatro de los pacientes de nuestro estudio (3, 4, 5 y 9) presentaron un inicio de la clínica espinal. Ninguno de los pacientes incluidos en nuestro estudio inició con una forma respiratoria.

VIII. a. 2. Edad de inicio de la clínica

Las edades de inicio de la clínica de los pacientes oscilaban entre los 33 y los 86 años con una media de 64.33 (DE 16.75) y una mediana de 67. Se considera ELA de inicio juvenil aquella que empieza antes de los 25 años, siguiendo esta definición ninguno de nuestros pacientes se encontraría dentro de un inicio juvenil (Aggarwal y Shashiraj 2006).

VIII. a. 3. Sexo de los pacientes y controles

Cuatro de los pacientes eran mujeres (1, 6, 7 y 8) y cinco de ellos eran varones (2, 3, 4, 5 y 9). Con respecto a los controles una era mujer y 4 varones.

VIII. a. 4. Tiempo desde el inicio al diagnóstico

La edad desde el inicio de la sintomatología hasta el diagnóstico oscila entre los 2 y los 38 meses, con una media de 12.44 meses (DE 11.56) y una mediana de 11 meses. Los pacientes con un menor tiempo desde el inicio de la clínica hasta el diagnóstico fueron los pacientes 6 y 9 con un tiempo de 2 meses.

VIII. a. 5. Edad en momento de fallecimiento de pacientes y controles

La edad en el momento del fallecimiento de los pacientes estaba comprendida entre los 38 y los 86 años, con una media de 65.6 (DE 15.94) y una mediana de 70 años.

Con respecto a los controles, las edades en el momento de fallecimiento estaban comprendidas entre los 64 y los 89 años con una media de 69.5 y una desviación estándar de 11.38 y una mediana de 72.5 años.

No existen diferencias significativas en cuanto a la edad entre pacientes y controles ($p=0,536$).

VIII. a. 6. Supervivencia desde el inicio de los síntomas

La supervivencia desde el inicio de los síntomas oscila entre 3 y 64 meses, con una media de 24,88 meses y una desviación estándar de 19,34. La mediana es de 18 meses.

Tabla 3: Resumen de las características de los pacientes. Leyenda F: femenino V: Varón

Número de paciente	Sexo	Forma de inicio	Edad al diagnóstico	Criterios de El Escorial	Tiempo desde inicio de síntomas al dgco. (meses)	Enfermedad asociada	VMNI	Riluzol	Edad muerte	Supervivencia desde inicio (meses)	Supervivencia desde dgco	Demencia
Paciente 1	F	Bulbar	65	Probable	23	No	No	No	67	24	1	Sí
Paciente 2	V	Bulbar	67	Probable	38	No	No	No	67	48	10	Sí
Paciente 3	V	Espinal	33	Definida	6	E. Crhon	Sí	Sí	38	64	58	No
Paciente 4	V	Espinal	59	Definida	11	Tabaquismo	Sí	Sí	61	18	7	No
Paciente 5	V	Espinal	45	Definida	6	No	Sí	Sí	46	17	11	No
Paciente 6	F	Bulbar	86	Probable	2	No	No	No	86	3	1	No
Paciente 7	F	Bulbar	81	Definida	11	No	Sí	Sí	82	14	3	No
Paciente 8	F	Bulbar	73	Definida	13	Temblor esencial	Sí	Sí	74	26	13	No
Paciente 9	V	Espinal	70	Probable	2	Miastenia gravis	Sí	Sí	70	10	8	No

VIII. a. 7. Supervivencia desde el diagnóstico

La supervivencia desde el diagnóstico oscila entre el mes y los 51 meses con una media de 12.44 y una desviación estándar de 17,72, la mediana es de 8 meses.

VIII. a. 8. Historia familiar

No constaba en ninguno de los casos historia familiar de enfermedad de neurona motora, demencia o enfermedades psiquiátricas. Este dato fue comprobado durante la entrevista telefónica estructurada realizada a los familiares.

VIII. a. 9. Estudio genético de los pacientes

Tres de los pacientes realizaron el estudio genético en vida, se trata de los pacientes 2, 3, y 8.

En el paciente 2 se estudiaron las mutaciones de la *SOD1*, expansión del *C9ORF72* y *FUS* que fueron negativos.

En el paciente 3 que había comenzado la clínica a los 33 años, se encontraron 2 mutaciones en la SOD [-109A>G] + [*317T>C], estas mutaciones no se habían descrito previamente en la literatura, por lo que se solicitó a la familia la posibilidad de realizar un estudio de ligamiento para esclarecer la patogenicidad o no de las mismas, sin embargo, no se consiguió obtener muestras de los familiares, por lo que estas mutaciones deben considerarse como de patogenicidad desconocida. Se realizó además estudio de la expansión del *C9ORF72* y de la angiogenina que no mostraron alteraciones.

En la paciente 8 se analizaron los genes de la *SOD1* que mostró un polimorfismo previamente conocido 357+89delA no patogénico. Se realizó además estudio de la expansión del *C9ORF72* y de la angiogenina que no mostraron alteraciones.

El resto de los pacientes no se realizaron el estudio genético en vida.

VIII.a.10. Deterioro cognitivo

Como se ha descrito previamente, los pacientes 1 y 2 comenzaron su sintomatología como un deterioro cognitivo previo a la enfermedad de neurona motora. De hecho, ambos eran seguidos en la unidad de neurología cognitiva de nuestro centro y el diagnóstico de su patología era de variantes de demencia frontotemporal.

La paciente 1 inició su clínica cognitiva aproximadamente 2 años antes de los síntomas de neurona motora bulbar. Esta clínica cognitiva se caracterizaba por una dificultad para nombrar las cosas a la que se asociaba un cierto grado de apatía y dificultades de memoria. Por este motivo estaba diagnosticada de demencia frontotemporal tipo afasia primaria progresiva. Dos años después inicia la clínica de disartria y disfagia con discreta debilidad de extremidades lo que llevó al diagnóstico de ELA. Desde el momento del diagnóstico hasta la muerte de la paciente transcurre menos de un mes.

Los síntomas del paciente 2 comenzaron con un cuadro de apatía con trastorno del comportamiento tendencia a compras inapropiadas y alteración del control de impulsos. A este cuadro se asocia temblor, y más tarde algún déficit de memoria. Debido a estos síntomas el paciente había sido diagnosticado de demencia frontotemporal. El cuadro cognitivo debutó aproximadamente 4 años antes del principio de la clínica de neurona motora. En este caso, el paciente presenta disfagia, disartria muy leve y debilidad generalizada. Desde el inicio de la clínica motora el paciente fallece en 3 meses.

Estos dos pacientes tenían una clínica relativamente similar: un deterioro cognitivo de perfil frontal de unos años de evolución (uno variante afásica y otro variante conductual) al que se asocia el cuadro de neurona motora muy rápidamente progresivo que lleva a la muerte en poco tiempo por insuficiencia respiratoria.

Con respecto a otros posibles síntomas cognitivos en pacientes sin diagnóstico de demencia, en la paciente 6 está descrita la asociación con un cuadro depresivo pero no constaba en la historia las características del mismo. Asimismo, en la paciente 7 esta descrito alteración del ánimo con alteración del sueño REM, aunque sin cuadro cognitivo asociado. En el paciente 5 se describe también un trastorno del ánimo, aunque sin deterioro cognitivo asociado. En ninguna de las historias de los otros pacientes existe registro de alteraciones cognitivas, quejas de memoria o cambios de carácter. Sin embargo, debe reseñarse que no se realizó en ellos un estudio cognitivo reglado. Se incluyó en la encuesta estructurada a los familiares preguntas referentes a alteraciones del ánimo o cambios cognitivos sin que se obtuviera ningún resultado diferente a los referidos. El resumen de las alteraciones cognitivas se expone en la tabla 4.

Tabla 4: Resumen de las alteraciones cognitivas

	Ánimo	Apatia	Carácter	Memoria	Lenguaje	Sueño REM	Neuroimagen	Dgco demencia
Paciente 1	0	+	0	+	++	0	Atrofia frontal y temporal	Frontotemporal Afasia primaria progresiva
Paciente 2	0	+	++	+	0	0	Atrofia frontal y temporal	Demencia frontotemporal
Paciente 3	0	0	0	0	0	0	Atrofia cortical	0
Paciente 4	0	0	0	0	0	0	Normal	0
Paciente 5	+	0	0	0	0	0	Normal	0
Paciente 6	++	0	0	0	0	0	Atrofia Frontal y temporal	0
Paciente 7	+	0	0	0	0	++	Atrofia frontal y temporal	0
Paciente 8	0	0	0	0	0	0	Atrofia frontal y temporal	0
Paciente 9	0	0	0	0	0	0	Atrofia frontal y temporal	0

VIII. a. 11. Pruebas de neuroimagen

En todos los pacientes incluidos en el estudio se realizaron pruebas de neuroimagen. La prueba realizada para todos fue una RM excepto la paciente 1 de la que solo se dispone de TAC. Algunos de los estudios se realizaron fuera de nuestro centro y las imágenes no pudieron ser analizadas. En los pacientes con deterioro cognitivo se observaba atrofia marcada de predominio frontal y temporal, sobre todo el paciente 2 (imágenes 24 y 25 en anexo de material suplementario). Pero muchos de los pacientes sin clínica referida de deterioro cognitivo también presentaban atrofia, sobre todo frontal y

temporal. Es el caso de la paciente 7 (imagen 26 en anexo de material suplementario), aunque en esta paciente estaba descrito un trastorno del sueño REM y alteraciones del ánimo y los pacientes 3, 6, 8 (imagen 27 en anexo de material suplementario) y 9, en los dos últimos se describían además lesiones vasculares antiguas.

Los pacientes 4 y 5 tenían pruebas de neuroimagen normales (imagen 28 anexo de material suplementario).

El resumen de las alteraciones en las pruebas de neuroimagen se ha incluido en la tabla 4.

VIII. a. 12. Uso de ventilación mecánica no invasiva

Seis de los pacientes recibieron tratamiento con ventilación mecánica no invasiva, que continuaban en el momento del fallecimiento, se trata de los pacientes 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Ninguno de los pacientes del estudio recibió ventilación mecánica invasiva.

VIII. a. 13. Condiciones asociadas

Con respecto a las enfermedades asociadas, es de destacar que dos de los pacientes asociaban enfermedades consideradas autoinmunes: El paciente 3, que había iniciado su clínica en una edad relativamente joven (en la década de los 40 años) y con mutaciones en la *SOD1* de patogenicidad desconocida, estaba diagnosticado de enfermedad de Crhon. El paciente 9 estaba previamente diagnosticado de miastenia gravis (con timoma asociado y anticuerpos antireceptor de acetilcolina positivos), por lo que en este caso resultó difícil discriminar el momento exacto de inicio de la enfermedad.

La paciente 8 estaba diagnosticada de un temblor esencial familiar, esta patología se ha considerado por algunos como una enfermedad neurodegenerativa (Benito-Leon 2014) con una mayor tasa de deterioro cognitivo (Benito-Leon *et al.* 2013). Aunque en nuestro caso no existía clínica de trastorno cognitivo asociado referido por ella ni en la encuesta realizada posteriormente a los familiares.

VIII. a. 14. Enfermedades neurológicas asociadas en los controles

No existía en la historia clínica de los controles ninguna referencia a enfermedades neurodegenerativas, trastornos de memoria o trastornos del comportamiento.

Tan sólo uno de los pacientes tenía historia previa de enfermedad cerebrovascular y constaba que había llegado a presentar crisis epilépticas sin secuelas significativas. Se trata del control 2.

VIII. a.15. Tratamiento etiopatogénico con riluzol

Solo tres de los pacientes no recibían tratamiento con riluzol en el momento de su fallecimiento eran los pacientes 1, 2 y 6. En estos tres casos el diagnóstico fue realizado en un estadio muy avanzado de la enfermedad por lo que no se inició el tratamiento etiopatogénico.

VIII. b. Resultados neuropatología

Los resultados del estudio neuropatológico de los cerebros de los pacientes y controles se resume en la tabla 5. El peso de los cerebros fijados se encuentra igualmente en dicha tabla. No existían diferencias significativas entre el peso de los controles (1290 g +/- 72.73) y los pacientes con ELA (1220 g +/-147) ($p=0,244$). Todos los pacientes se diagnosticaron desde un punto de vista neuropatológico de esclerosis lateral amiotrófica.

Tabla 5: Resumen de las alteraciones neuropatológicas de pacientes y controles

	Peso	Atrofia prefrontal	Atrofia raíces anteriores	Depósito de amiloide	Pérdida de neuronas motoras medular	Inclusiones médula	Inclusiones hipocampo
Paciente 1	1200	0	+	+++	+++	+	+
Paciente 2	1200	0	0	0	++	+	+
Paciente 3	1520	+	0	0	++	0	0
Paciente 4	1320	0	+	0	+++	0	0
Paciente 5	1220	0	0	0	+++	0	0
Paciente 6	1000	0	0	0	+++	0	0
Paciente 7	1280	+	0	+	++	0	+
Paciente 8	1120	0	0	0	++	+	+
Paciente 9	1120	0	0	0	++	+	+
Control 1	1200	0	0	0	0	0	0
Control 2	1360	0	0	+	0	0	0
Control 3	1265	0	0	0	0	0	0
Control 4	1335	0	0	0	0	0	0

Leyenda: 0 Ausencia de alteraciones, + alteración presente, ++ alteración presente de forma moderada, +++ alteración presente de forma marcada.

Desde el punto de vista macroscópico, se describe atrofia de la circunvalación prerrolandica en los pacientes 8 y 9 y en ninguno de los controles. Asimismo, existía un

adelgazamiento de las raíces anteriores a nivel medular en los pacientes 1 y 5 y en ninguno de los controles.

En cuanto a las alteraciones microscópicas encefálicas, en la paciente 1 llamaba la atención la presencia de numerosos ovillos neurofibrilares y placas de amiloide, por todo ello la paciente cumplía criterios anatomopatológicos para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. La paciente 8 presentaba también placas seniles aunque en un número reducido. En el paciente 2 se observó pérdida de neuronas motoras a nivel del bulbo. El control 2 presentaba escasos ovillos con Tau fosforilada pero no constaban en su historia quejas de alteración de memoria ni del comportamiento en el paciente.

Todos los pacientes presentaban una pérdida muy importante en las neuronas del asta anterior medular, en los casos 1 y 5 prácticamente no quedaban neuronas motoras en esta localización (imagen 29 en anexo de material suplementario).

En lo que respecta a las inclusiones se describían en los informes de las necropsias inclusiones positivas para la ubiquitina en hipocampo y médula en los pacientes 1, 2, 4 y 9 (imagen 30 en anexo de material suplementario). El paciente 8 solo presentaba en la necropsia las inclusiones en el hipocampo. Sin embargo cuando se analiza desde un punto de vista cuantitativo la cantidad de células positivas para la ubiquitina con inmunofluorescencia, vemos que en todos los pacientes existe un aumento significativo de las mismas (Gráfico 1).

La media de inclusiones ubiquitinadas es de $0,5 \pm 0,58$ en los controles frente a $7,43 \pm 2,7$ en los casos con ELA ($p = 0,007$), (gráfico 1). La diferencia se mantiene cuando se analizan por separado los controles frente a los pacientes sin DFT ($0,5 \pm 0,58$ vs $7,67 \pm 0,8$; $p=0,01$). Los pacientes que asociaban demencia frontotemporal mantenían esta diferencia ($8,5 \pm 0,5$) aunque no fue posible realizar el estudio estadístico al tratarse solo de dos pacientes. En este caso no se encontraron diferencias entre los pacientes que recibían tratamiento con riluzol o no ($8 \pm 2,53$ vs. $7 \pm 2,65$; $p=0,694$); los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos frente a los que no ($7 \pm 2,35$ vs. $8,5 \pm 2,65$; $p=0,533$), o las formas de inicio bulbar y espinal ($6,6 \pm 0,93$ vs $9 \pm 1,23$; $p=0,155$).

En todos los casos existe un porcentaje significativo de células en las que la TDP-43 se encuentra localizada en el citoplasma. Esto puede observarse igualmente en los gráficos 2 y 3, en el gráfico 2 se observa cómo no existe una diferencia significativa entre la TDP-43 total (nuclear y citoplasmática) (control $12,25 \pm 3,5$ vs. total ELA $14,04 \pm 3,42$) $p=0,486$, tampoco cuando se analizan los controles frente a los pacientes sin DFT (control $12,25 \pm 3,4$ vs. ELA sin DFT $13,20 \pm 3,24$; $p=0,776$). Pero sí cuando se analiza el porcentaje de TDP-43 citoplasmática (control vs. total ELA (control $1,21 \pm 0,87$ vs. total ELA $19,26 \pm 10,48$) ($p=0,003$), gráfico 3. Cuando la ELA no asocia DFT esta diferencia es también significativa (control $1,21 \pm 0,87$ vs. ELA sin DFT $15,81 \pm 8,92$, $p=0,006$). En el caso de la ELA con DFT el incremento es mayor $31,78 \pm 1,66$, aunque el estudio estadístico no puede realizarse debido al reducido tamaño de la muestra.

Cuando se analizan los pacientes en función de que hubiesen sido tratados con riluzol o no encontramos también una diferencia significativa. Los pacientes en tratamiento con riluzol presentan un menor porcentaje de TDP-43 en el citoplasma (No riluzol $30,86 \pm 2,23$ vs. riluzol $13,61 \pm 7,4$; $p=0,024$), gráfico 4.

No se encontraban diferencias entre los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos ($24,82 \pm 4,77$ vs. $12,54 \pm 2,72$, $p=0,076$), ni con la forma de inicio bulbar frente a espinal ($24,98 \pm 10,32$ vs. $12,33 \pm 5,70$; $p=0,111$), ni según el sexo (mujeres $23,67 \pm 11,43$ vs. $15,91 \pm 9,40$, $p=0,413$).

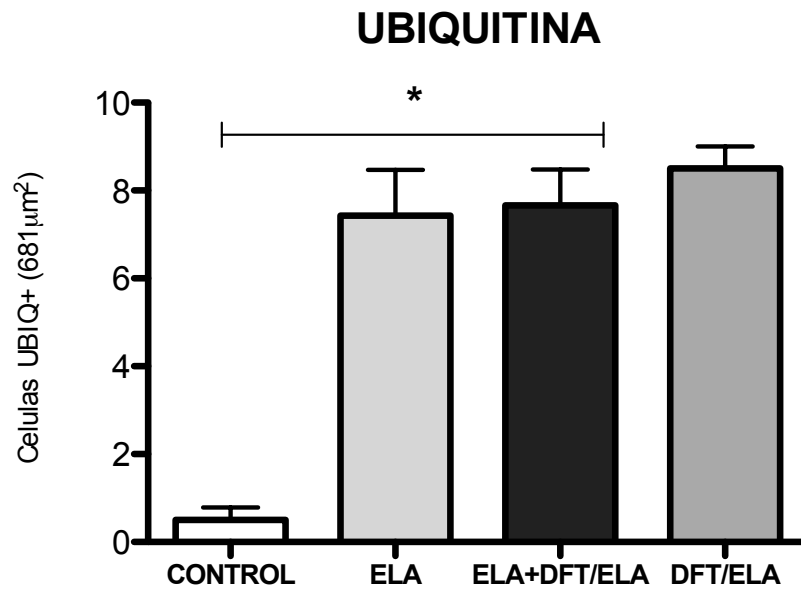


Gráfico 1: Inclusiones de ubiquitina en pacientes y controles. Se observa un incremento significativo del número de células que presentan inclusiones positivas para la ubiquitina con respecto al control. Este aumento ocurre para todos los grupos sin que existan diferencias significativas entre los pacientes con o sin demencia frontotemporal asociada.

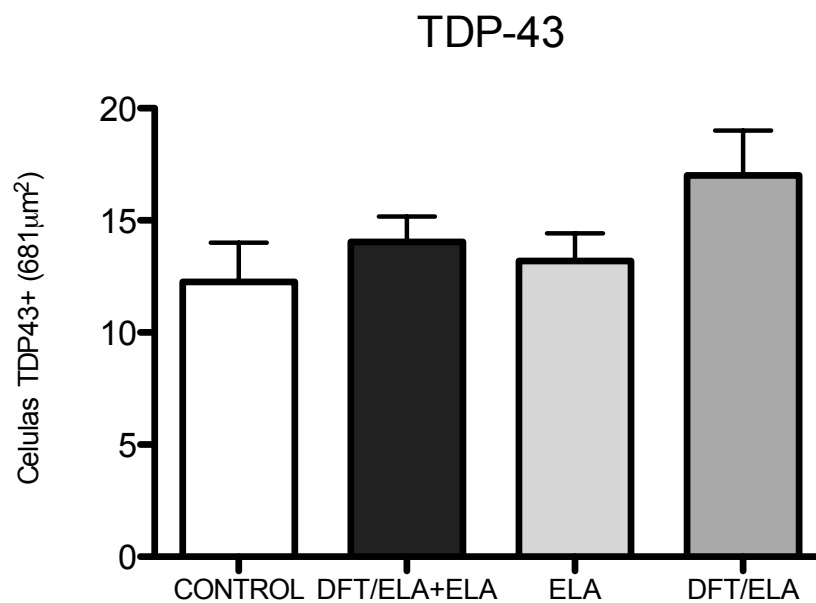


Gráfico 2: Inclusiones de TDP-43 total en pacientes y controles. No existen diferencias significativas en el número de células TDP43+ entre los diferentes grupos de ELA y los controles.

% pTDP43 EN CITOPLASMA

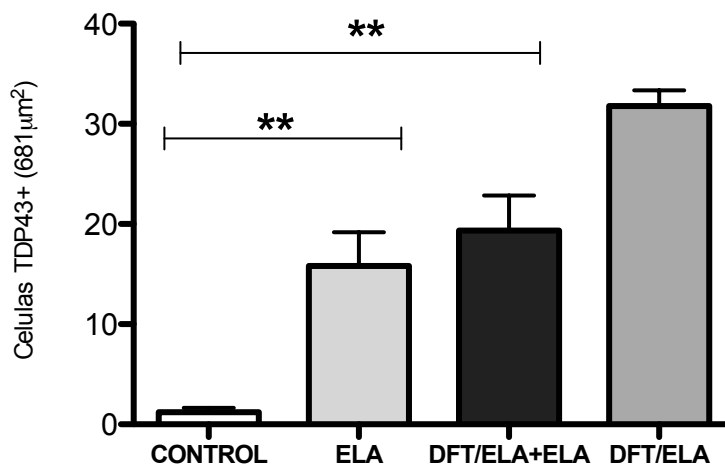


Gráfico 3: Porcentaje de inclusiones TDP-43 fosforiladas en el citoplasma de pacientes y controles. Cuando se observa el porcentaje de células con TDP-43 citoplasmática con respecto al total de células TDP-43 positivas, existe un incremento significativo en el total de pacientes con ELA y en los pacientes con ELA sin demencia. Este aumento es mayor cuando la ELA se asocia demencia.

% pTDP-43 citoplasmática

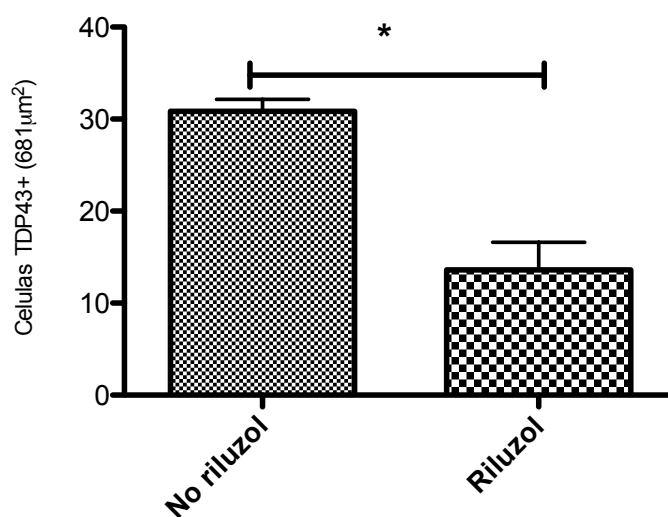


Gráfico 4: Porcentaje de TDP-43 citoplasmática fosforilada en los pacientes según su tratamiento. Cuando se analiza el porcentaje de células con TDP-43 positivas en el citoplasma con respecto al total se observa que existe una reducción significativa de las mismas en los pacientes tratados con riluzol.

VIII. c. Resultados del estudio de la neurogénesis

VIII. c. 1. Estudio de la neurogénesis en la zona subventricular

VIII. c. 1. a. Modificación del nicho neurogénico

En lo que se refiere a la morfología del nicho, la zona subventricular (SVZ), se divide clásicamente en tres porciones: el epéndimo, la capa *GAP* o hipocelular y la capa *ribbon* o astrocitaria (imagen 2). Cuando se analiza el tamaño de esas capas con respecto a los controles no observamos cambios en la zona endimaria pero tanto la capa *GAP* como la capa *ribbon* se encuentran aumentadas en su espesor (tabla 6 y tabla 10 en anexo, gráficos 5 y 6, imagen 8).

En el caso de la capa *GAP*, gráfico 5, existen diferencias entre los controles y el total de pacientes con ELA (controles $44,75 \pm 8,02$ vs. ELA $73,78 \pm 3,57$; $p=0,007$), esta diferencia existe también cuando se comparan controles con los pacientes con ELA sin demencia ($44,75 \pm 8,02$ vs. $71,14 \pm 3,99$; $p=0,006$). El grosor de la capa no se modifica por la toma de riluzol ($72,33 \pm 11,02$ vs. $76,67 \pm 11,68$; $p=0,604$), con la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos ($76 \pm 8,78$ vs. $71 \pm 13,59$; $p=0,389$), con la forma de inicio bulbar o espinal ($74,2 \pm 10,76$ vs. $73,25 \pm 12,28$; $p=0,902$) o cuando se consideraba el sexo (mujeres $73 \pm 12,03$ vs. hombres $74,4 \pm 10,95$), $p=0,806$).

En el caso de la capa astrocitaria *ribbon* (gráfico 6), existen diferencias entre el total de los pacientes con ELA ($89,89 \pm 16,09$) y los controles ($53,5 \pm 5,51$), $p=0,003$. De nuevo las diferencias son significativas cuando se analizan los controles y los pacientes con ELA sin demencia ($53,5 \pm 5,51$ vs. $87,29 \pm 13,28$; $p=0,006$). No existen diferencias entre los pacientes que tomaban o no riluzol ($88,83 \pm 5,65$ vs. $92 \pm 13,5$, $p=0,801$), presentaban o no síntomas neuropsiquiátricos ($88,6 \pm 17,27$ vs. $91,50 \pm 16,92$; $p=0,905$), tenían una

forma de inicio era bulbar o espinal ($87,8 \pm 17,51$ vs. $92,5 \pm 16,28$; $p=0,73$) ni según el sexo de los pacientes (mujeres $90 \pm 19,41$ vs. hombres $89,8 \pm 15,34$, $p=1$).

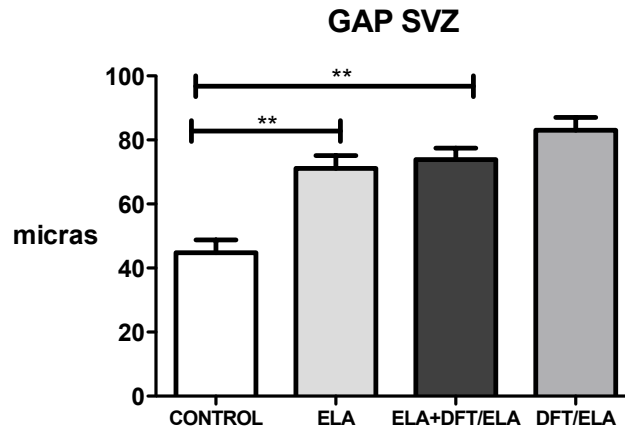


Gráfico 5: Tamaño de la capa hipocelular (GAP) en los pacientes y controles. En el gráfico se observa un aumento del espesor de la capa GAP en la SVZ que es significativo tanto para los pacientes con o sin demencia frontotemporal como para el conjunto de pacientes.

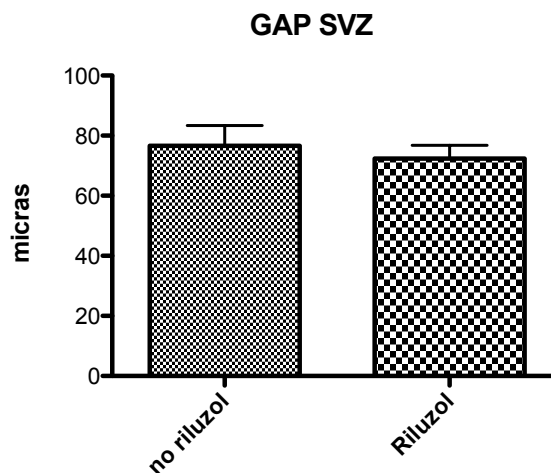


Gráfico 6: Tamaño de la capa GAP en los pacientes según su tratamiento. No se observan diferencias significativas en el tamaño de la capa GAP entre los pacientes tratados o no con riluzol.

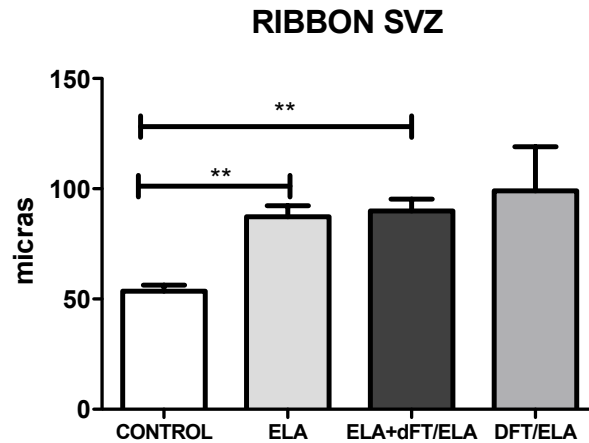


Gráfico 7: Tamaño de la capa *ribbon* (astrocitaria) en los pacientes y controles. Se observa un aumento del grosor de la capa *ribbon* tanto en los casos de ELA sin demencia, como en el total de casos de ELA. Esta diferencia existe también para los casos con ELA asociada a DFT, pero dado el pequeño número de pacientes no se puede realizar el estudio de significación estadística.

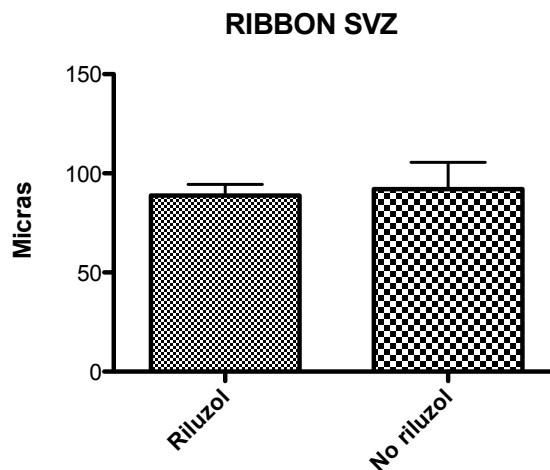


Gráfico 8: Tamaño de la capa astrocitaria (*ribbon*) de los pacientes según su tratamiento. No se observan diferencias significativas en el tamaño de la capa *ribbon* (astrocitaria) entre los pacientes tratados o no con riluzol.

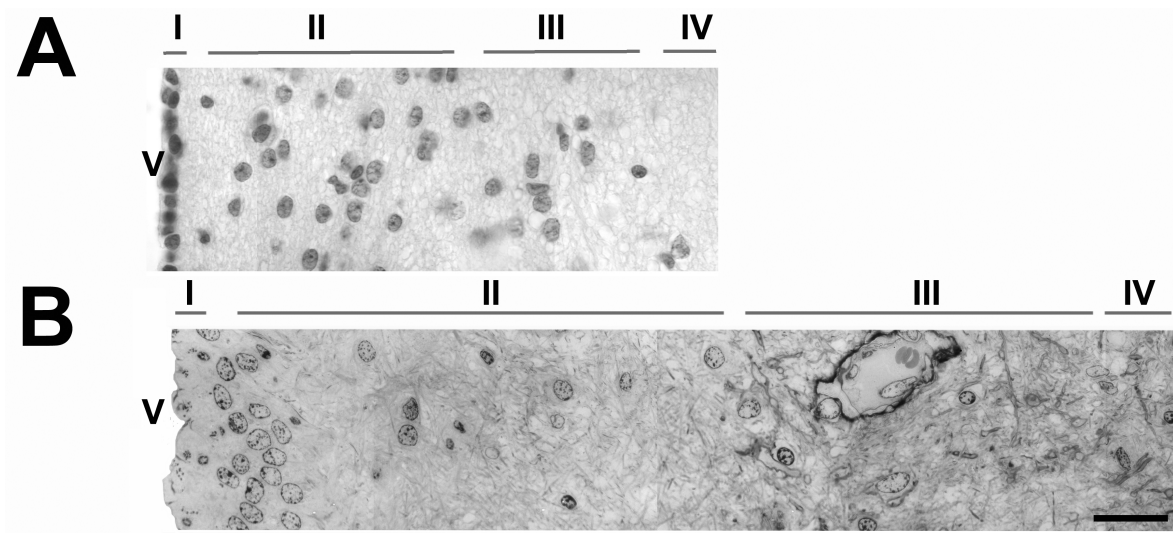


Imagen 8: Estructura de la SVZ en la ELA y el control. Se observa la estructura de la SVZ en el control (A) y la paciente 1 (B), V: ventrículo lateral, I: capa endimaria, II: capa GAP hipocelular, III: Capa ribbon astrocitaria, IV Parénquima. La barra corresponde a 40 μm. La letra V corresponde al ventrículo. Puede apreciarse el aumento del tamaño de las capas hipocelular y *ribbon*.

VIII. c. 1. b Estudio de la proliferación de las células neurales progenitoras proliferativas (tipo B)

Como marcador de células tipo B se utilizó el GFAP. Este marcador es un marcador de astrocitos pero, dado que estas células se han considerado células madre en la SVZ, es importante analizar su expresión y si esta corresponde o no con la de los otros marcadores de células tipo B. Con este marcador se observó un incremento de las mismas en los pacientes con ELA con respecto a los controles (ELA 119,9 \pm 18,97 vs. Controles 87 \pm 11,34, $p=0,013$) (Gráfico 9, imagen 9 y 11). Las diferencias se mantienen cuando se comparan los controles con los pacientes sin DFT ($p=0,023$). Este incremento de la astrocitosis está directamente relacionado con un cambio en la estructura del nicho de la SVZ. No existían diferencias significativas entre los pacientes con o sin riluzol (riluzol 113,2 \pm 13,27 vs. no riluzol 133,3 \pm 24,34, $p=0,381$), gráfico 10, los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos (125,7 \pm 6,15) o no (99,5 \pm 10,50) $p=0,081$, ni las formas de inicio bulbar (129.2 \pm 18.34) frente a las espinales (108.3 \pm 13.65), $p=0,19$. Tampoco existían diferencias en cuanto al sexo (mujeres 112,3 \pm 32,16 vs. hombres 121,6 \pm 22,50), $p=0,712$. Como se puede comprobar posteriormente este incremento es paralelo al de los otros marcadores de células tipo B, y además en los estudios de inmunofluorescencia

combinada podemos ver que ambos marcadores colocalizan. Es decir, en este caso, podemos afirmar que la mayor parte de las células marcadas con GFAP son células neurales progenitoras proliferativas, células tipo B.

En los pacientes con demencia frontotemporal encontramos además un gran número de células tipo C que extendían una prolongación hasta el ventrículo lateral, esta imagen se ha descrito previamente en animales (Quinones-Hinojosa *et al.* 2006), pero hasta la fecha no se había encontrado asociada a enfermedades (imagen 14).

Se utilizaron tres marcadores para medir la proliferación de las células neurales pluripotenciales: PCNA, KI-67, PHOS-H3. Con todos ellos, salvo con el PHOS-3, se comprueba un aumento de la proliferación celular en la zona subventricular que es estadísticamente significativo, este aumento es mucho más marcado en los pacientes con demencia frontotemporal asociada, aunque no se puede valorar si esta diferencia es estadísticamente significativa dado el pequeño tamaño de la muestra (gráficos 11, 13 y 15) (tabla 6 y tabla 10 en anexo).

En el caso del PCNA (gráfico 11) la media para los controles era de $24,25 \pm 3,30$ frente a todos los pacientes con ELA $73,22 \pm 9,83$, $p=0,002$. Las diferencias son significativas también cuando se analizan de forma aislada los controles frente a los pacientes con ELA sin demencia ($24,25 \pm 3,3$ vs. $69 \pm 1,83$; $p=0,006$). Dado que sólo hay dos pacientes con ELA con DFT asociada, aunque esta diferencia parece ser mayor, no podemos realizar un estudio estadístico fiable. No se encuentran diferencias significativas entre los pacientes tratados o no con riluzol ($1,25 \pm 0,61$ vs. $0,33 \pm 0,58$; $p=0,102$) (gráfico 12), los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos ($75,8 \pm 13,08$ vs. $70 \pm 2,16$; $p=0,73$), los que tenían forma de inicio bulbar o espinal ($76 \pm 12,9$ vs. $69,75 \pm 2,63$; $p=0,556$) o según su sexo ($74,5 \pm 14,39$ vs. $72,20$) $p=1$ (gráficos en anexo)

En el caso del Ki-67, el número de células marcadas para los controles eran $14,75 \pm 2,06$ frente a $46,89 \pm 17,40$ para los casos de ELA, este aumento es significativo con

una $p = 0,007$ (gráfico 13, imagen 9, 11 y 12). Estas diferencias existen también cuando se analizaban por separado los controles frente a los pacientes con ELA sin demencia ($14,75 \pm 2,06$ vs. $38,43 \pm 1,99$; $p=0,01$). No había diferencias entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol ($39,5 \pm 4,84$ vs. $61,67 \pm 25,7$, $p=0,437$), gráfico 14, los que presentaban o no síntomas neuropsiquiátricos ($52,80 \pm 21,88$ vs. $39,5 \pm 6,14$, $p=0,623$) ni la forma de inicio bulbar o espinal ($52,60 \pm 22,02$ vs. $39,75 \pm 6,19$; $p=0,806$) o el sexo (mujeres $59,75 \pm 19,62$ vs. hombres $36,3 \pm 4,3$, $p=0,065$ (gráficos en anexo).

Cuando se utiliza el marcador phos-H3 no se encuentran diferencias significativas (gráfico 15, imagen 10 y 13) en la comparación de ninguno de los grupo. La media para los controles era de $3,5 \pm 0,58$ frente a $3,0 \pm 3,90$ para todos los casos de ELA ($p=0,94$); $2,71 \pm 2,75$ para los casos de ELA sin DFT ($p=0,385$). Tampoco existían diferencias entre los pacientes que tomaban o no riluzol ($3 \pm 2,90$ vs $6,67 \pm 5,13$; $p=0,237$) gráfico 16, los pacientes que presentaban o síntomas neuropsiquiátricos ($5,4 \pm 4,72$ vs $2,75 \pm 2,36$; $p=0,533$), los pacientes con formas de inicio bulbar o espinal ($4,2 \pm 4,9$ vs. $4,25 \pm 2,754$, $p=0,901$) ni según el sexo de los pacientes (mujeres $2,5 \pm 3,7$ vs. hombres $5,6 \pm 3,7$), $p=0,262$, gráficos en anexo.

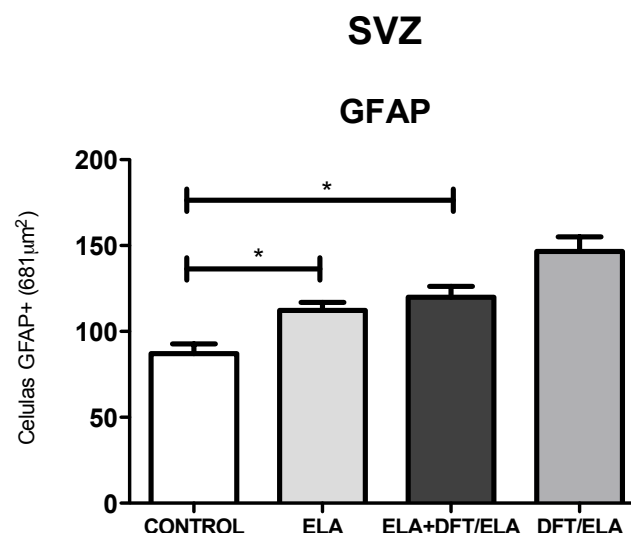


Gráfico 9: Número de células GFAP positivas en la SVZ de pacientes y controles. Se observa un incremento de los células B con respecto al control que es significativo de la astrocitosis, medida con el marcador GFAP en todos los casos de ELA, así como en los que no tienen demencia asociada. Este aumento parece mantenerse para los casos que asocian demencia frontotemporal aunque dado el escaso número de pacientes no se puede establecer si tiene o no significación estadística.

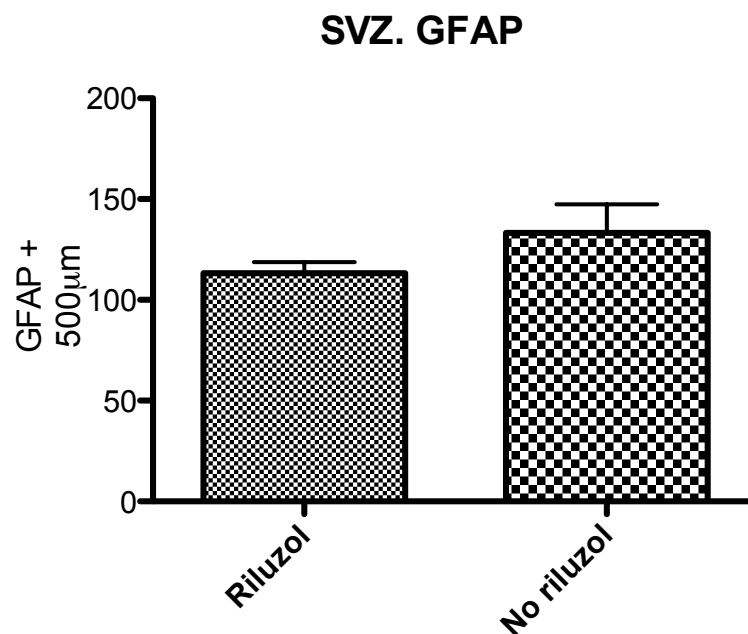


Gráfico 10: Número de células GFAP positivas en la SVZ de pacientes conforme a su tratamiento. No existen diferencias significativas en el número de células marcadas en la SVZ con GFAP entre los pacientes que tomaban tratamiento con riluzol y los que no lo hacían.

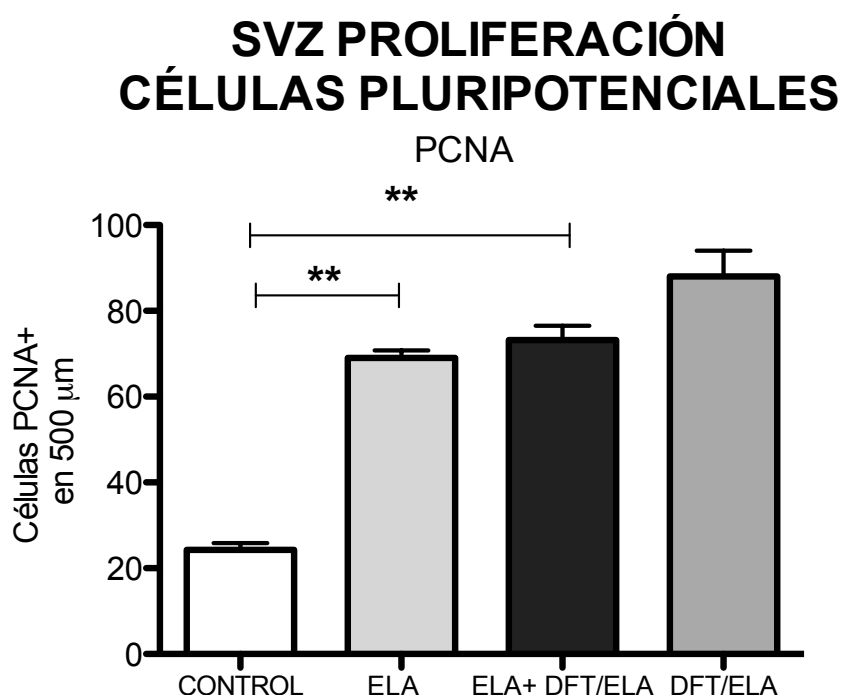


Gráfico 11: Número de células tipo B marcadas con PCNA en la SVZ pacientes y controles. Cuando se marcan las células madre pluripotenciales con PCNA se observa un aumento de la proliferación de las mismas que es significativo para todos los casos de ELA y para los casos que no asocian DFT. En los casos que asocian DFT el aumento parece ser mayor.

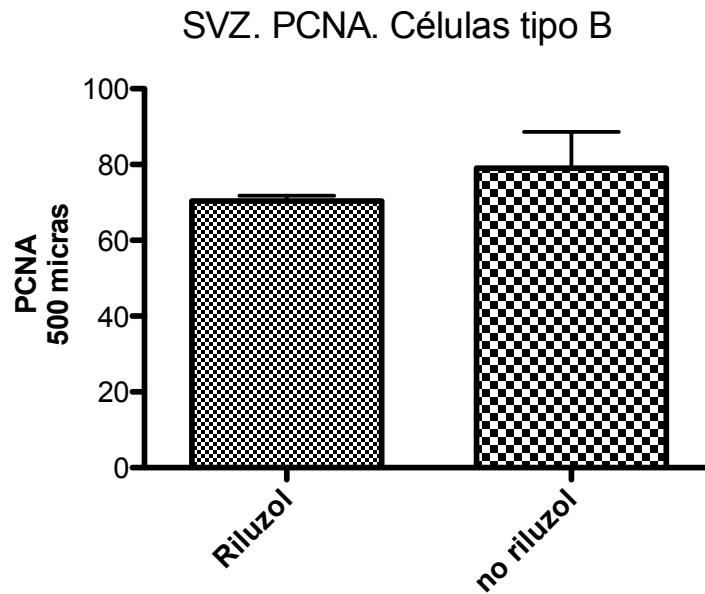


Gráfico 12: Número de células tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido. No existen diferencias significativas entre el número de células neurales progenitoras proliferativas (tipo B) marcadas con PCNA entre los pacientes con o sin tratamiento con riluzol.

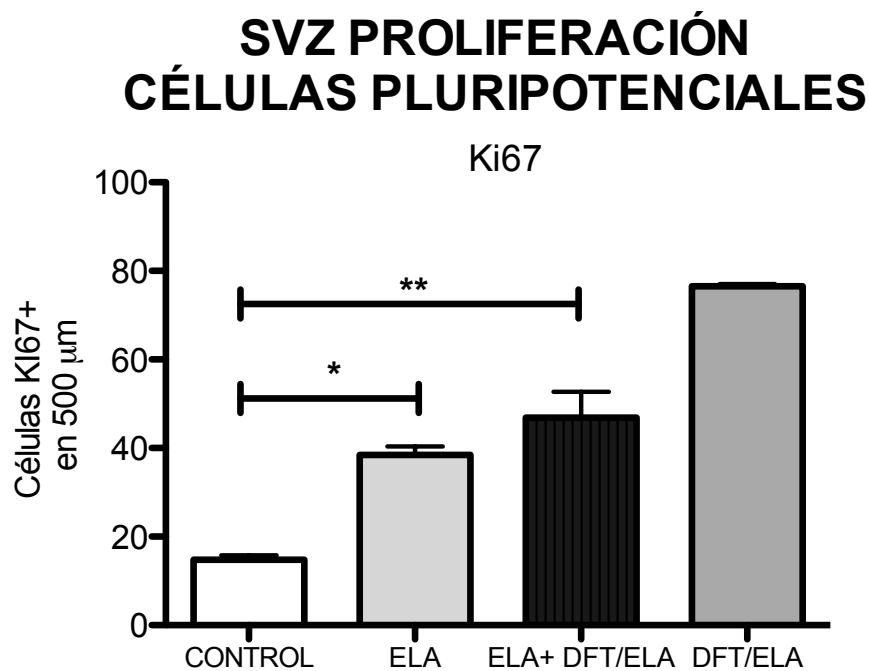


Gráfico 13: Número de células B marcadas con Ki67 en la SVZ de pacientes y controles. Se observa un aumento significativo de la proliferación de células pluripotenciales marcadas con Ki67, este aumento parece ser aún mayor cuando se consideran los pacientes con demencia frontotemporal, aunque no es posible realizar un análisis estadístico confiable debido al reducido número de pacientes. estadístico.

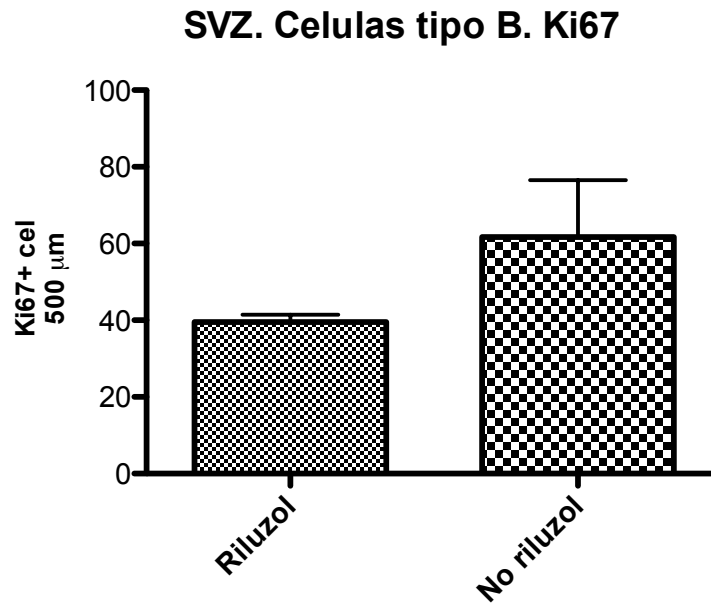


Gráfico 14: Número de células B marcadas con Ki67 en pacientes según el tratamiento recibido. No se observan diferencias significativas en el número de células neurales progenitoras proliferativas (tipo B) marcadas con Ki-67 según reciban o no tratamiento con riluzol.

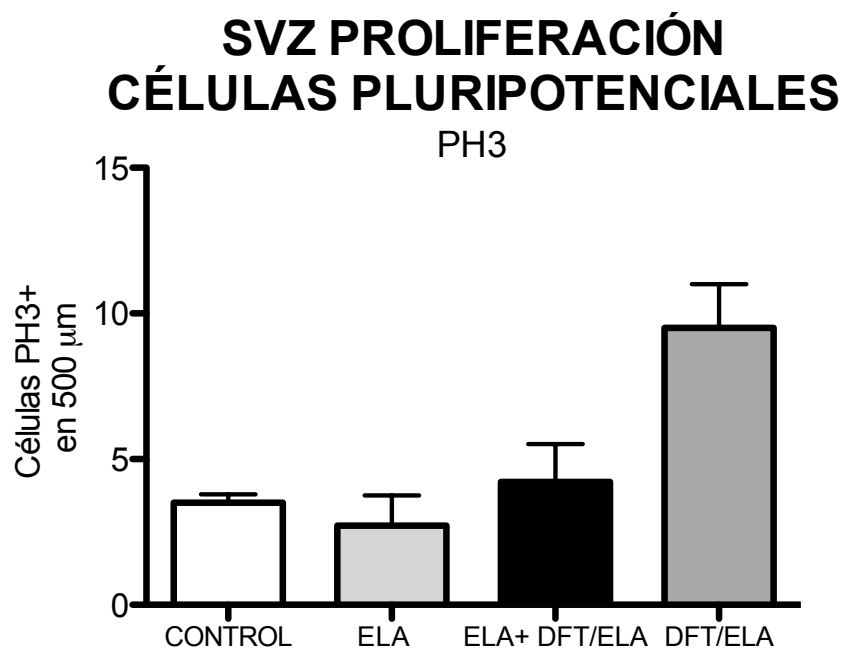


Gráfico 15: Número de células B marcadas con fosfohistona-3 en la SVZ de pacientes y controles. Cuando se utiliza el marcador fosfo-histona 3 para observar la proliferación de las células pluripotenciales en las SVZ no existen diferencias significativas estadísticamente. Aunque existe un gran aumento en los casos con demencia frontotemporal asociada, de nuevo no es posible realizar un análisis estadístico fiable dado el bajo número de pacientes.

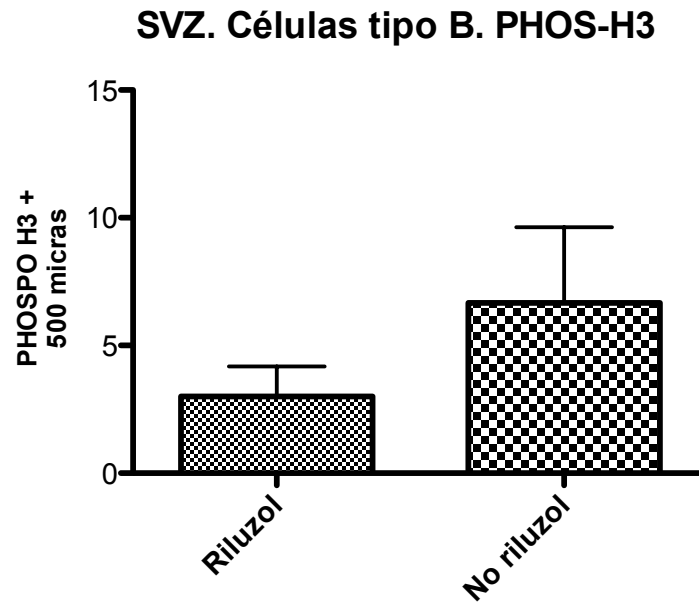


Gráfico 16: Número de células tipo B marcadas con fosfohistona-3 en la SVZ de los pacientes según el tratamiento recibido. No se observan diferencias significativas entre el número de células neurales progenitoras proliferativas marcadas con fosfohistona 3 (células tipo B) entre los pacientes con y sin tratamiento con riluzol.

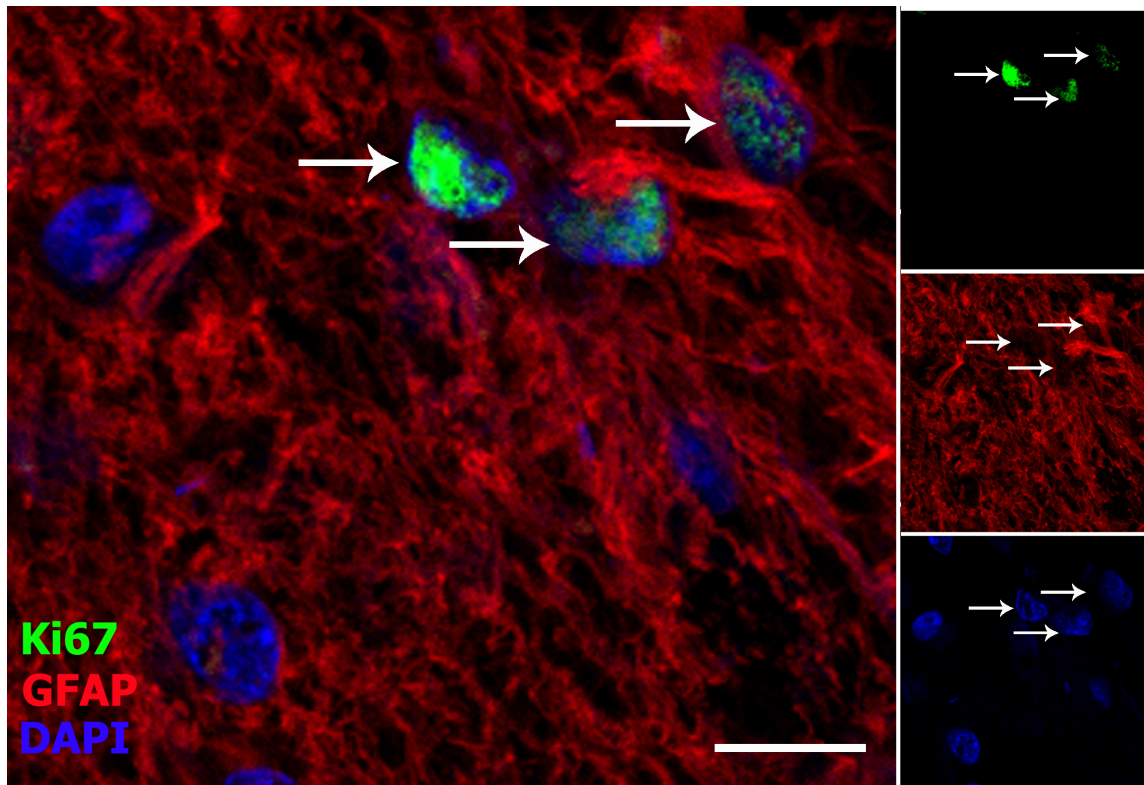


Imagen 9: Las células que marcan para GFAP lo hacen también para Ki67 en la SVZ. Se observa la proliferación de las células neurales progenitoras tipo B en la paciente 1 marcadas con Ki67 y como éstas células corresponden a células marcadas con GFAP. La barra corresponde a 12 μm

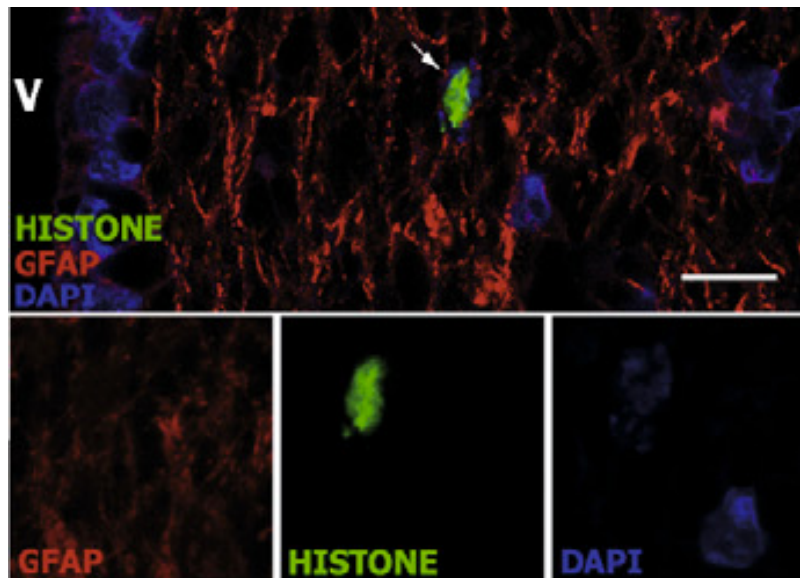


Imagen 10: Las células que marcan para GFAP lo hacen también para fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes con ELA. Se observan las células neurales progenitoras marcadas con PHOS-H3 y como estas mismas células se marcan con GFAP en la paciente 1. La letra V corresponde al ventrículo lateral. La barra corresponde a 20 μm .

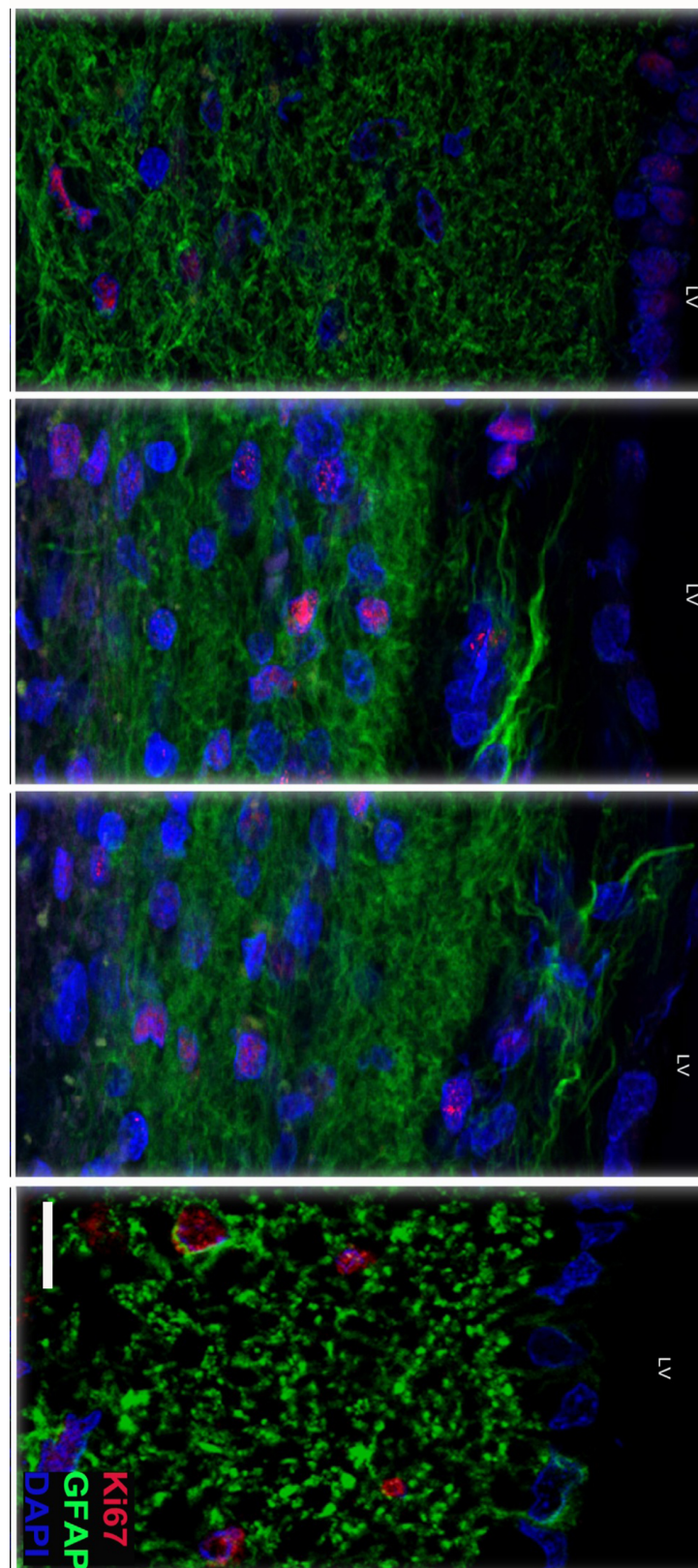


Imagen 11: Aumento de las células madre neurales en la SVZ de los pacientes con ELA y con ELA con DFT frente a controles. Se observa un aumento del número de células proliferativas tipo B marcadas con Ki-67 en la SVZ de los pacientes con FTD y ELA fila 2, y los pacientes con ELA, fila 3 y 4, frente a los controles, fila 1. La barra corresponde a 20 μ m.

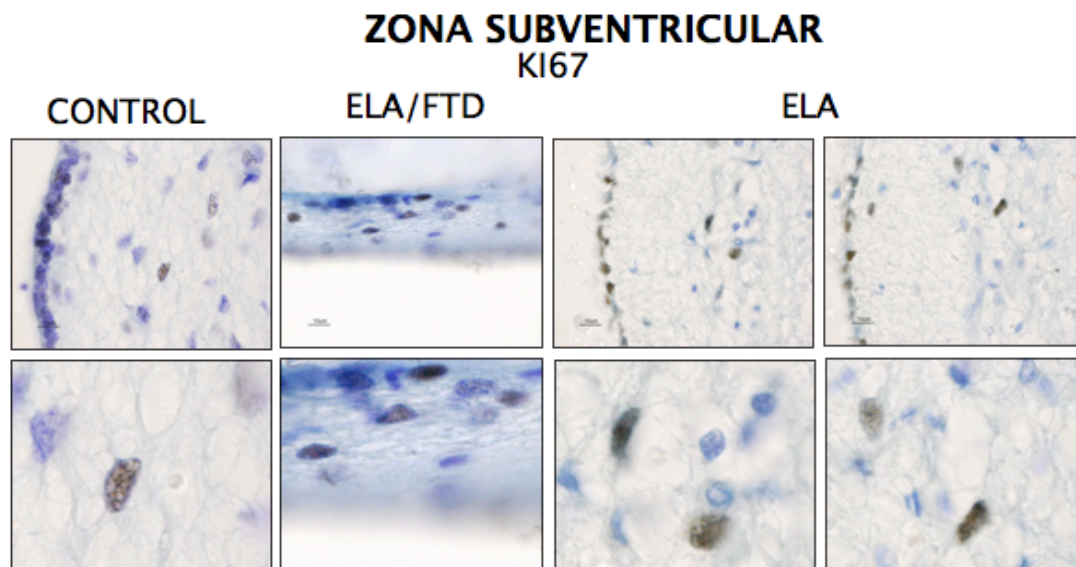


Imagen 12: Proliferación de las células madre neurales tipo B en la SVZ de los pacientes con ELA. Se observa un incremento del número de células marcadas con Ki-67 células tipo B en los pacientes con ELA asociada a DFT columna 2 y con ELA sin DFT columnas 3 y 4.

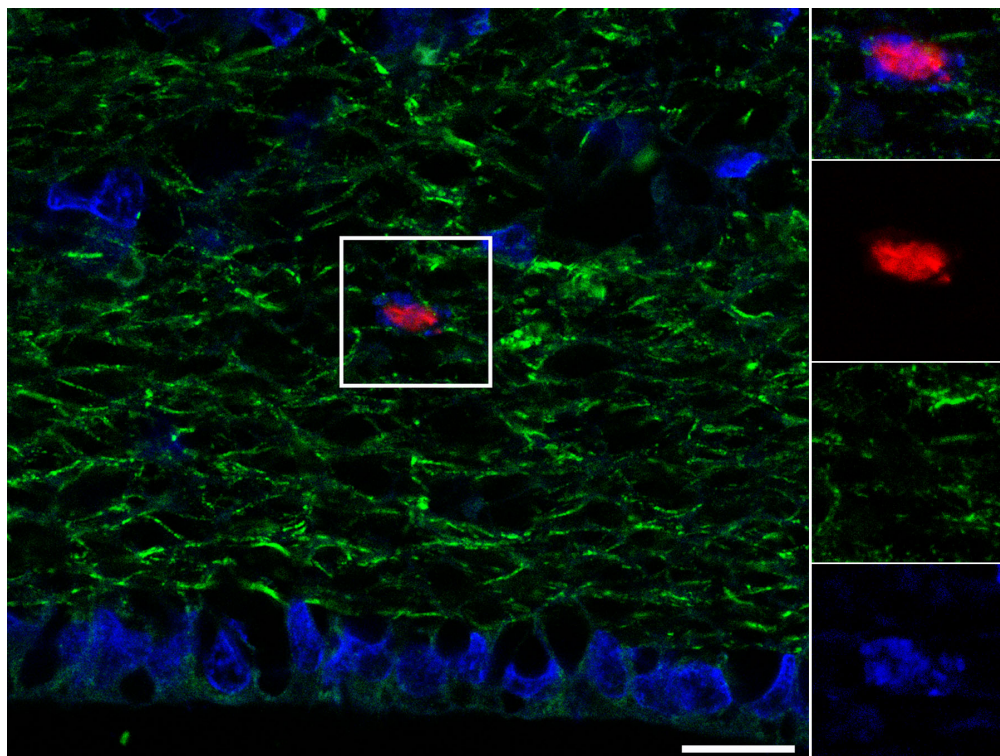


Imagen 13: En la SVZ de los pacientes con ELA se observan células madre marcadas para fosfohistona 3. En la imagen se pueden observar las células de tipo B marcadas con PHOS-H3 en la paciente 1. La barra corresponde a 15 μ m.

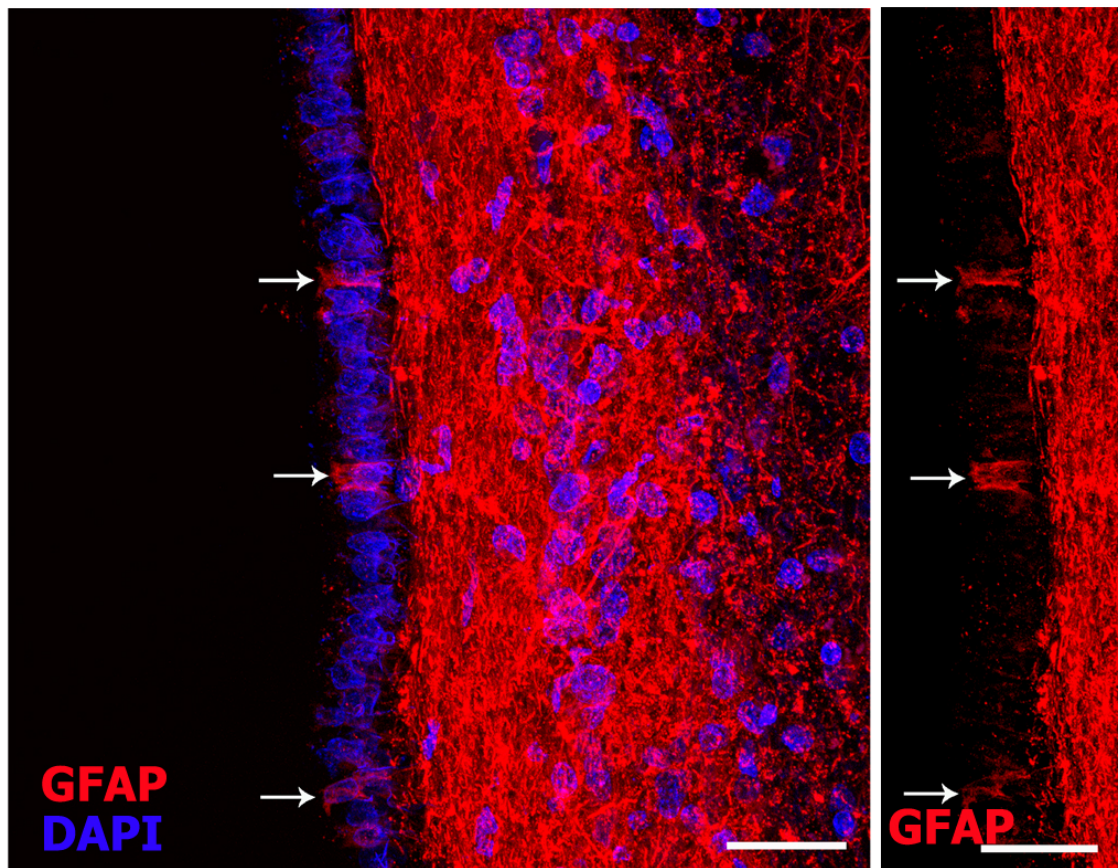


Imagen 14: En la SVZ de los pacientes con ELA y demencia frontotemporal existen numerosos astrocitos que emiten una prolongación hacia el ventrículo. Imagen perteneciente a la paciente 1. Se observan abundantes fibroblastos que emiten sus prolongaciones hasta el ventrículo lateral. La barra corresponde a 50 μ m

VIII. c. 1. c. Estudio de las células neurales pluripotenciales, tipo C

Para estudiar la segunda fase celular en el nicho, la fase de las NPCs, células tipo C, se utilizó el GFAP δ . Esta fase celular puede también ser positiva para los marcadores de proliferación pero lo que la diferencia de la fase B es que no marcan para GFAP α sino para GFAP δ . Cuando estudiamos este marcador encontramos un aumento significativo de las NPCs en el total de los pacientes de ELA con respecto a los controles, que existe también para los pacientes con ELA sin demencia pero que es más marcado en los pacientes que asocian DFT, de nuevo esta diferencia es estadísticamente significativa (Controles 10,75 \pm 2,36 vs. ELA total 35,89 \pm 14,49, $p=0,007$; controles 10,75 \pm 2,36 vs. 29 \pm 2,05

ELA sin DFT , $p=0,01$) (gráfica 13). Cuando hacemos el análisis entre los pacientes que toman riluzol y los que no lo toman, no hay diferencias significativas entre ambos grupos (No riluzol $46,67 \pm 13,38$ vs. riluzol $30,5 \pm 1,65$; $p=0,1185$). Igualmente no se encontraron diferencias entre los pacientes que presentaban síntomas neuropsiquiátricos frente a los que no los presentaban ($41,20 \pm 8,08$ vs. $29,25 \pm 2,14$, $p=0,2422$). Ni cuando se analizaron las formas de inicio bulbar frente a las de inicio espinal ($39,80 \pm 8,63$ vs. $31 \pm 1,23$, $p=0,401$), ni según el sexo de los pacientes (mujeres $35,25 \pm 18,93$ vs. hombres $36,40 \pm 12,26$, $p=0,902$) -gráficos en anexo-

SVZ NPC GFAP- δ

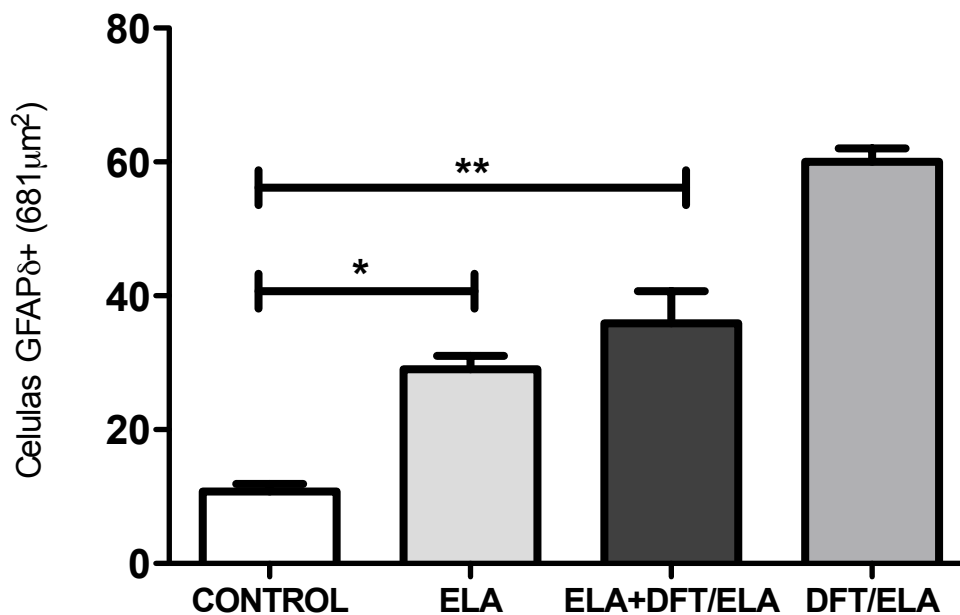


Gráfico 17: Número de células neurales pluripotenciales marcadas con GFAP δ en pacientes y controles. Con el marcador de células neurales pluripotenciales GFAP delta, cuando se estudia la SVZ, se encuentra un aumento de este marcador para todos los casos de ELA, asocien o no demencia frontotemporal. El grado de significación estadística es mayor cuando se consideran el total de casos que si se consideran los casos con ELA sin DFT. Esto parece estar en relación con un aumento más marcado de los casos con ELA y DFT, aunque dado el pequeño número de pacientes no es posible realizar un análisis confiable.

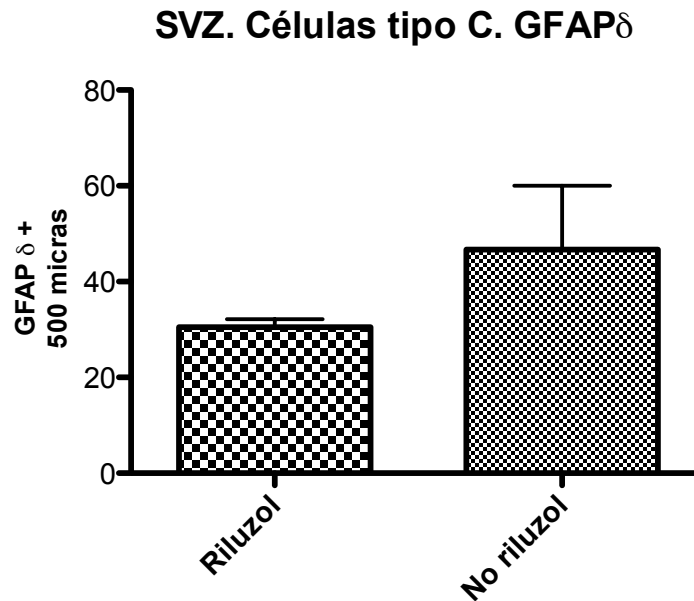


Gráfico 18: Número de células neurales pluripotenciales en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido. No se observan diferencias significativas entre la cantidad de células tipo C marcadas con GFAP δ en los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol.

VIII. c. 1. d. Estudio de la neurogénesis en la SVZ: Fase de neuroblastos, células A

Se utilizaron tres marcadores para neuroblastos PSA-NCAM (gráfico 19), doblecortina (gráfico 21) y Tuj-1.

En el caso del PSA-NCAM se encontró un incremento de la cantidad de células marcadas por cada 500 μ m con este anticuerpo para los pacientes con ELA 19,78 células \pm 1,63 y los controles 6,5 células \pm 2,51, con una $p=0,007$. Las diferencias son significativas cuando se analizan por separado controles 6,5 células \pm 2,51 contra pacientes con ELA sin DFT 18 células \pm 3,51 ($p=0,01$). Cuando se estudia el grupo de pacientes con ELA y demencia frontotemporal el aumento en la cantidad de neuroblastos con este marcador es mayor (DFT/ELA 26 \pm 3 vs. 6,5 \pm 1,25), pero dado que el tamaño de la muestra de pacientes con demencia frontotemporal es de 2 individuos, resulta imposible afirmar la significación estadística de dicha diferencia, gráfico 19, imagen 15 y 16. No se encontraron diferencias significativas en el número de células marcadas con PSA- NCAM cuando se valoró si los pacientes recibían tratamiento con riluzol (18,17 células \pm 3,82) o no (23

células ± 6) ($p=0,362$), gráfico 20, presentaban o no alteraciones neuropsiquiátricas (21,00 células $\pm 2,26$ vs. 18,25 células $\pm 2,46$; $p=0,439$), según la forma de inicio bulbar o espinal (21,4 células $\pm 4,83$ células vs. 17,75 $\pm 4,79$); $p=0,537$, ni con el sexo (mujeres 21 $\pm 5,47$ vs. hombres 18,8 $\pm 4,76$, $p=0,902$ (gráficos en anexo)

Cuando se realizó el estudio de los neuroblastos con el marcador doblecortina (DCX) se encontró un aumento significativo de las mismas cuando se consideraron el conjunto de casos con ELA frente a los controles (total ELA 21,33 células $\pm 1,44$ vs. controles 5,25 células $\pm 2,22$; $p=0,007$). Existían diferencias también cuando se analizaban de forma separada los controles (5,25 células $\pm 2,22$) frente a los casos sin demencia (20,86 $\pm 4,74$) $p=0,01$. Los casos que asocian demencia frontotemporal tienen un mayor número de células que los controles y que los pacientes con ELA (controles 5,25 células $\pm 2,22$ vs. ELA/DFT 23,00 ± 2), aunque dado el escaso número de pacientes no es posible establecer adecuadamente la significación estadística (gráfico 21, imagen 17). Tampoco con este marcador se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que tomaban riluzol y los que no lo hacían (20 células $\pm 1,86$ vs. 24 células $\pm 1,53$; $p=0,211$) gráfico 22, los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos frente a los que no la presentaban (23,2 células $\pm 1,36$ vs. 19 células $\pm 2,48$; $p=0,160$), ni de las formas de inicio bulbar frente a las espinales (23,8 células $\pm 2,17$ vs. 18,25 células $\pm 4,57$; $p=0,064$), ni con respecto al sexo de los pacientes (mujeres 23,5 $\pm 2,38$ vs. hombres 19,6 $\pm 4,98$), $p=0,217$ gráficos en anexo.

Existía igualmente un marcaje de las células en sus prolongaciones con el marcador Tuj1 pero no en el cuerpo neuronal por lo que no fue posible hacer un análisis cuantitativo.

SVZ NEUROBLASTOS

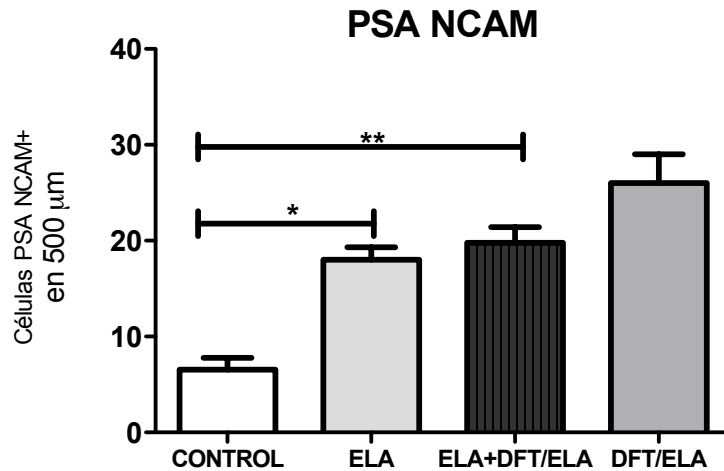


Gráfico 19: Número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de pacientes y controles. Se observa un incremento de los neuroblastos presentes en la SVZ cuando se utiliza el marcador de neuroblastos PSA NCAM, este incremento ocurre en todos los pacientes con ELA asocien o no demencia frontotemporal. Si bien existe una cierta tendencia a que este incremento sea mayor en los casos que asocian demencia frontotemporal no existen diferencias significativas.

SVZ NEUROBLASTOS

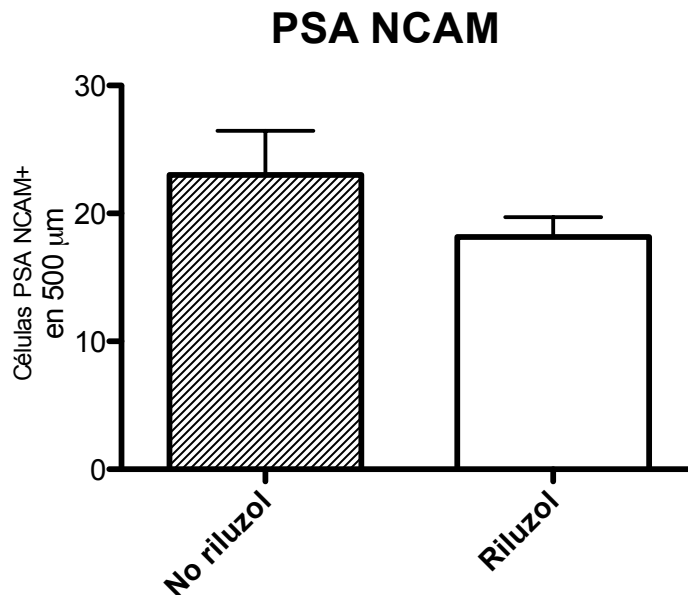


Gráfico 20: Número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido. Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes sin y con tratamiento con riluzol. No se observan diferencias significativas.

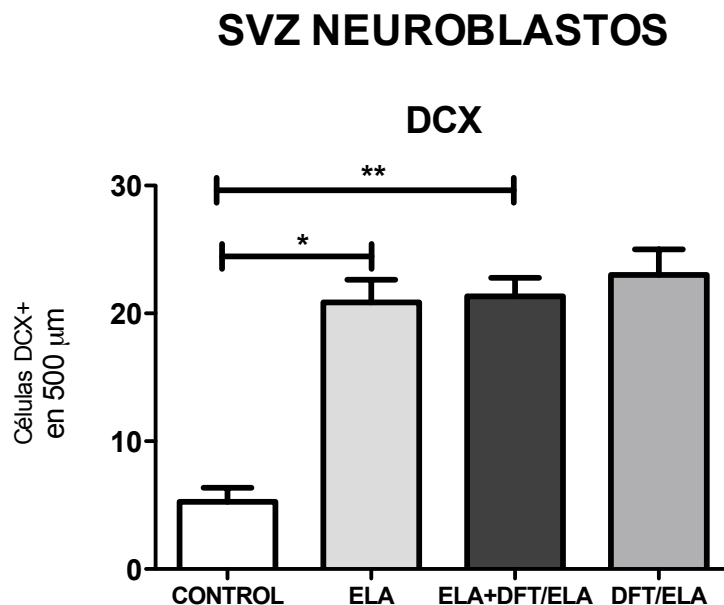


Gráfico 21: Número de neuroblastos marcados con doblecortina en la SVZ de pacientes y controles. Cuando se utiliza el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX) se observa un incremento de los mismos en la zona subventricular para todos los casos con ELA, con o sin demencia frontotemporal.

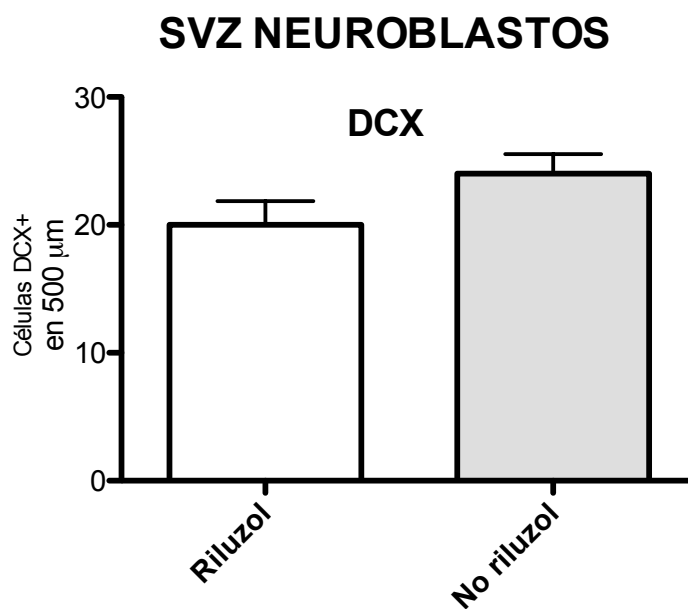


Gráfico 22: Número de neuroblastos marcados con doblecortina en la SVZ de pacientes según el tratamiento recibido. No existen diferencias en el número de neuroblastos marcados con DCX en los pacientes tratados o no con riluzol.

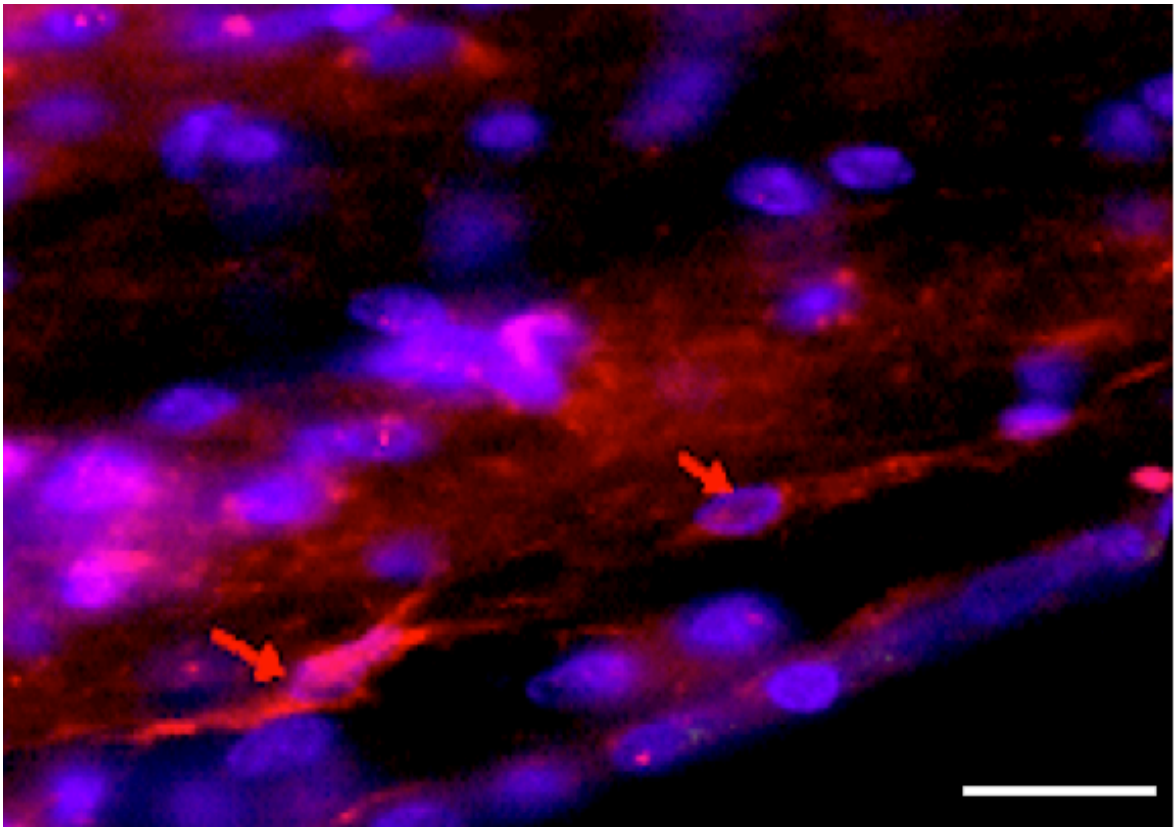


Imagen 15: El incremento de la neurogénesis en la SVZ de los pacientes con ELA afecta también a la fase de neuroblastos. Imagen procedente de la necropsia de la paciente 1, en la que se observan los neuroblastos células de tipo A marcados con el anticuerpo PSA-NCAM. La barra corresponde a 20 μm .

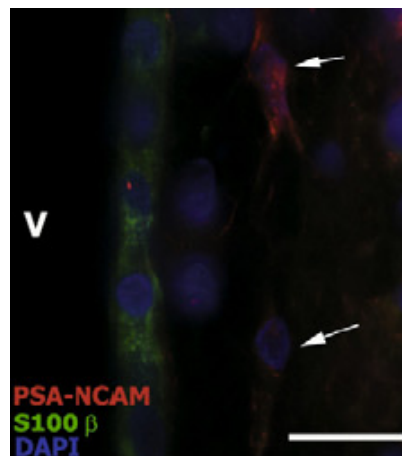


Imagen 16: Neuroblastos en un paciente con ELA. Se observan los neuroblastos marcadas con PSA-NCAM, el anticuerpo S100 β marca las células endimarias. La barra corresponde a 45 μm .

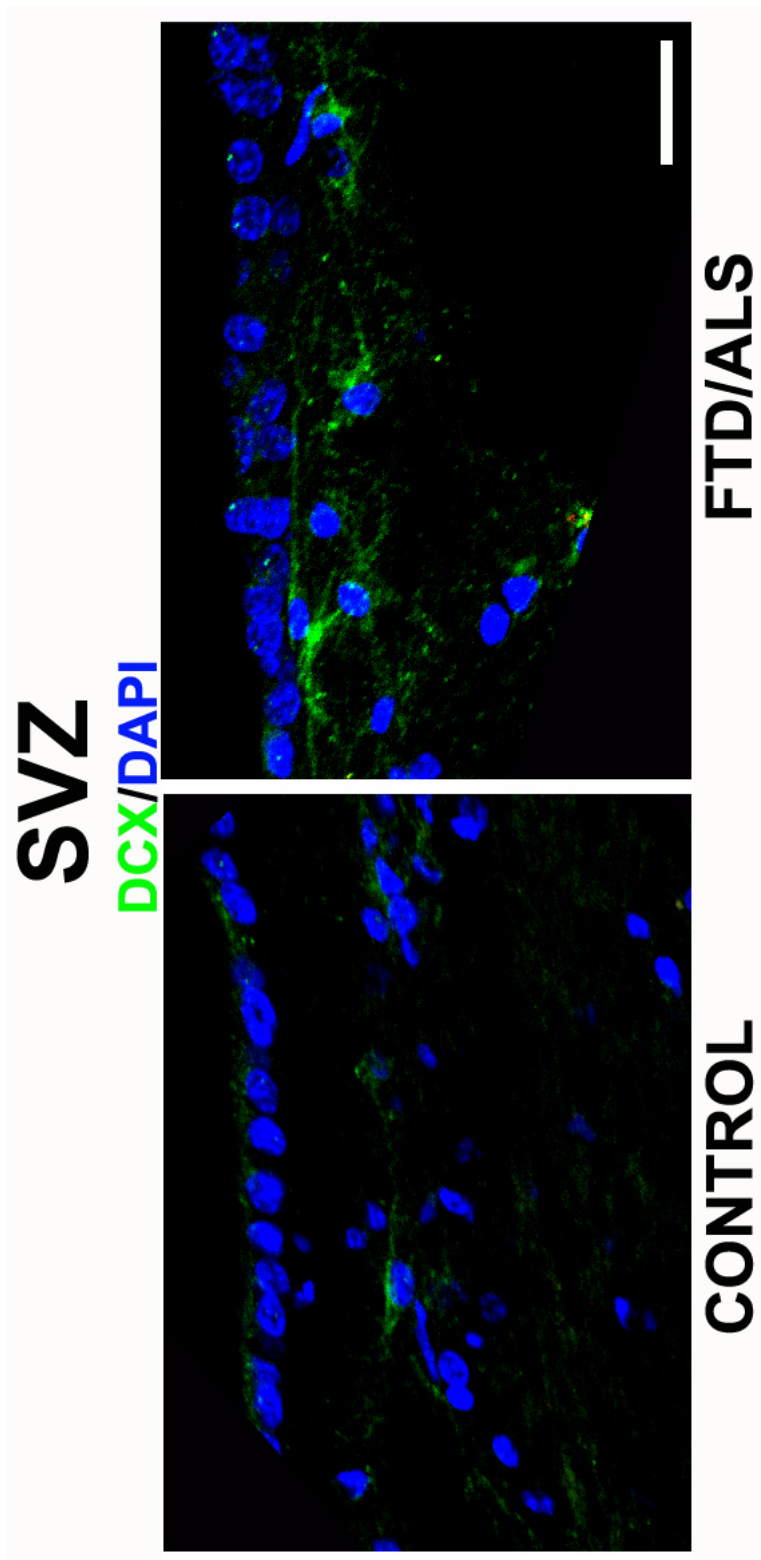


Imagen 17: El número de neuroblastos marcados con doblecortina aumenta en la SVZ de los pacientes con ELA y DFT. Estudio con doblecortina (marcador de neuroblastos en el control y en uno de los pacientes con demencia frontotemporal asociada (paciente 1). Se observa un marcado incremento de los neuroblastos en el paciente con ELA asociada a demencia frontotemporal. La barra corresponde a 25 μ m.

Tabla 6: Resumen de los resultados en la SVZ. Se considera significativo $p < 0,05$. ns= no significativo.

		CONTROL	TOTAL ELA	P	ELA SIN DFT	P
Estructura	Capa GAP	44,75 \pm 8,02	73,78 \pm 3.57	0,007	71,14 \pm 3.99	0,006
	Capa <i>ribbon</i>	53.5 \pm 5.51	89,89 \pm 16,09	0,003	87,29 \pm 13,28	0,006
	GFAP α	87 \pm 11.34	119 \pm 18.97	0,001	112,3 \pm 4.66	0,002
Proliferación	PCNA	24,25 \pm 3,3	73,22 \pm 9,83	0,002	69 \pm 1.86	0,003
	Ki67	14,75 \pm 2,06	46,89 \pm 17,40	0,007	38,43 \pm 1,99	0,01
	Phos-H3	3,5 \pm 0,58	3,0 \pm 3,90	ns	2,71 \pm 2,75	ns
NPCs	GFAP δ	10,75 \pm 2,36	35,89 \pm 14,49	0,007	29 \pm 2,05	0,01
Neuroblastos	PSA-NCAM	6,5 \pm 2,51	19,78 \pm 1,63	0,007	18 \pm 3,51	0,01
	DCX	5,25 \pm 2,22	21,33 \pm 1,44	0,01	20,86 \pm 4,74	0,001

VIII. c. 1. e. Estudio de la correlación de la neurogénesis con otras variables

Se realizó el estudio de la correlación de la neurogénesis en la SVZ con el porcentaje de TDP-43 citoplasmática. Con respecto a la propia estructura del nicho existía una correlación lineal y directa entre el porcentaje de células TDP-43 citoplasmática y el tamaño de la capa hipocelular (capa *GAP*) ($p=0,02$) gráfico 23 pero no con el tamaño de la capa astrocitaria (capa *ribbon*) ($p=0,057$).

En el caso del estudio de las células neurales progenitoras proliferativas tipo B, encontramos que existe una relación directa (a mayor TDP-43 mayor neurogénesis) y lineal entre la TDP-43 citoplasmática y la cantidad de células marcadas con GFAP ($p=0,005$), con PCNA ($p = 0.023$), gráfico 24 y la cantidad de células marcadas con Ki67 ($p=0.006$), gráfico 25, pero no con la PHOS-H3 (con la que tampoco se había encontrado un incremento significativo de la neurogénesis).

En el estudio de correlación entre la TDP-43 citoplasmática y la neurogénesis en estadio NPCs (células tipo C) marcadas por GFAP δ se encontró igualmente una correlación estadísticamente significativa, lineal y directa entre ambas variables ($p=0.004$), gráfico 26.

Existe también una correlación estadísticamente significativa lineal y positiva entre la TDP-43 citoplasmática y el número de neuroblastos (células tipo A) de la SVZ observado tanto con el anticuerpo PSA-NCAM $p=0,015$, gráfico 27, como con la doblecortina $p=0.0008$, gráfico 28.

No existían una correlación significativa entre ninguna de las variables estudiadas de la neurogénesis y la edad de los pacientes.

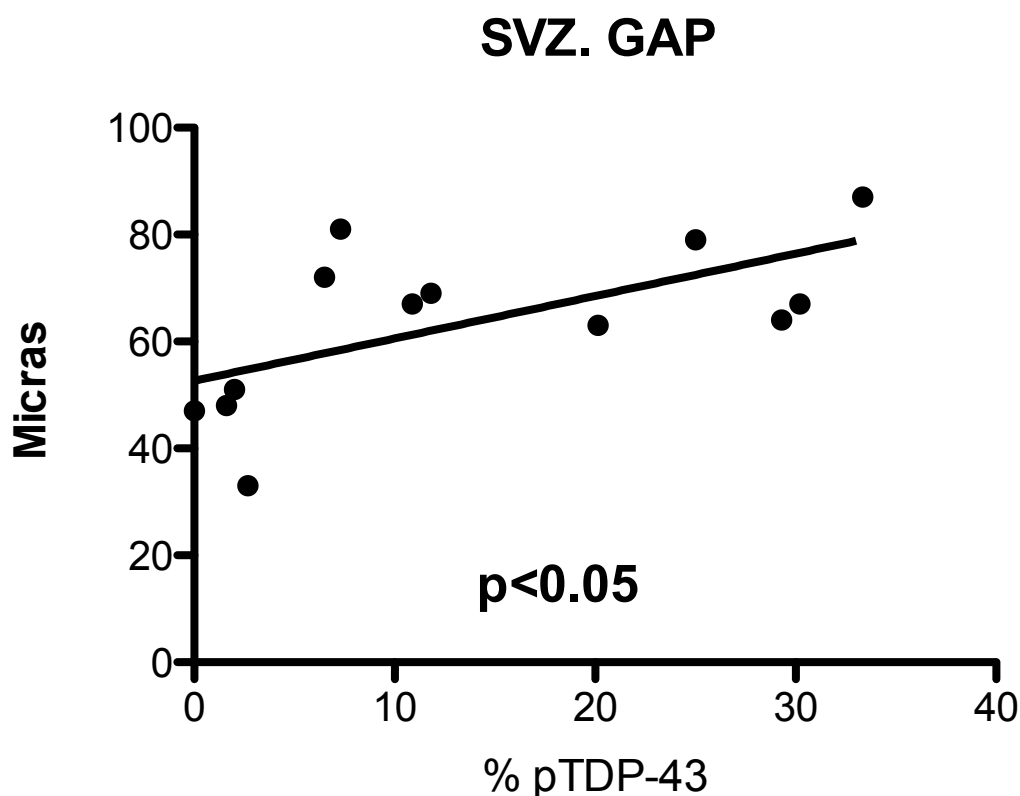


Gráfico 23: Correlación entre el tamaño de la capa GAP (hipocelular) y el porcentaje de TDP-43 fosforiladas en el citoplasma. Se observa la correlación entre el tamaño de la capa GAP y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada, esta correlación es lineal y directa.

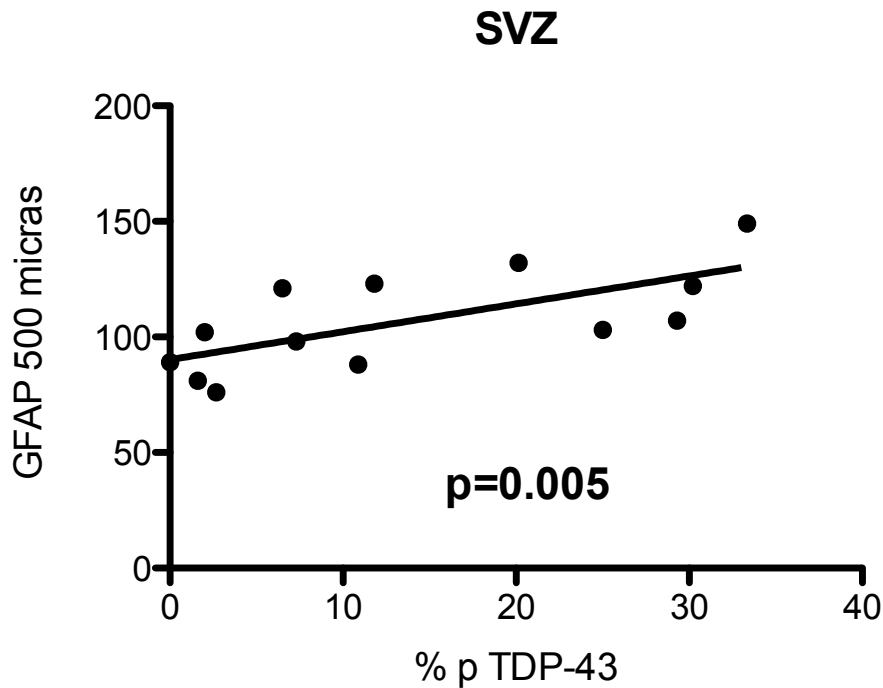


Gráfico 24: Correlación entre las células GFAP positivas de la SVZ y el porcentaje de TDP-43 citoplasmática fosforilada. Se observa la correlación entre las células GFAP de la SVZ y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada, esta correlación es lineal y directa. En el caso de la SVZ estas células GFAP+ colocalizan con otros marcadores de células de tipo B.

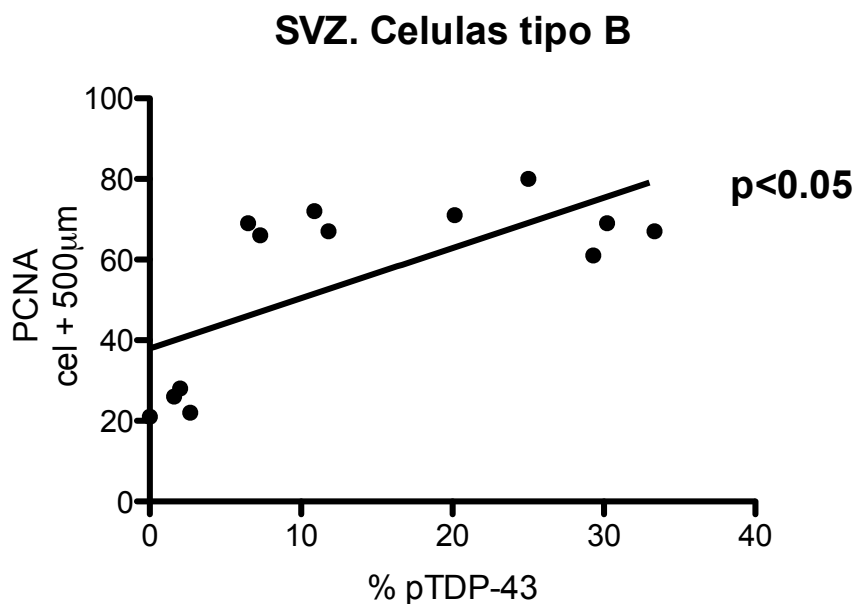


Gráfico 25: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células B en la SVZ marcadas con PCNA. Se observa la correlación entre la cantidad de células neurales progenitoras proliferativas tipo B (PCNA+) y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada. Esta correlación es lineal y directa.

SVZ. Células tipo B

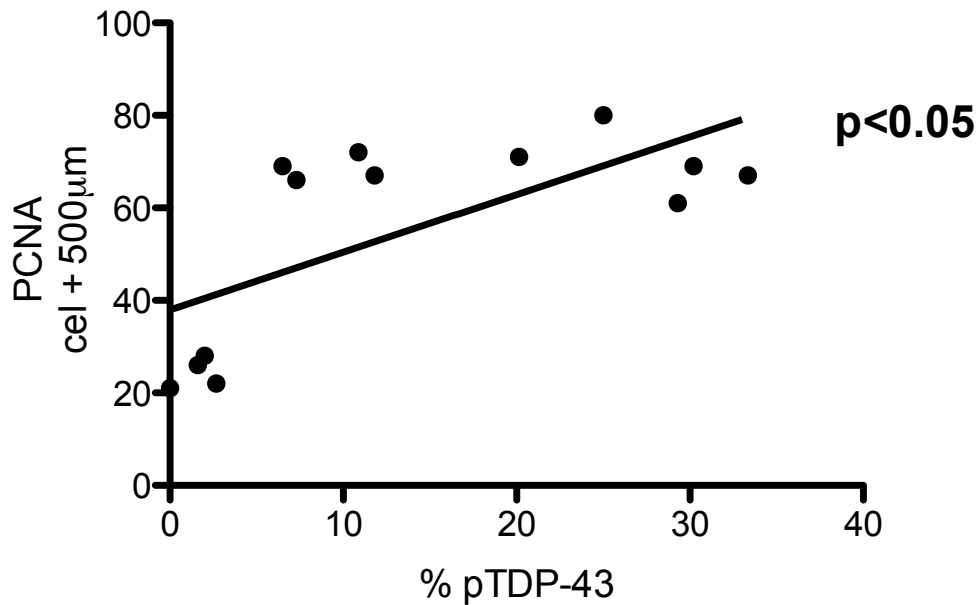


Gráfico 26: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células B de la SVZ marcadas con Ki-67. Se observa la correlación entre la cantidad de células neurales progenitoras proliferativas tipo B (Ki67+) y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada. La correlación es lineal y directa.

SVZ NPCs

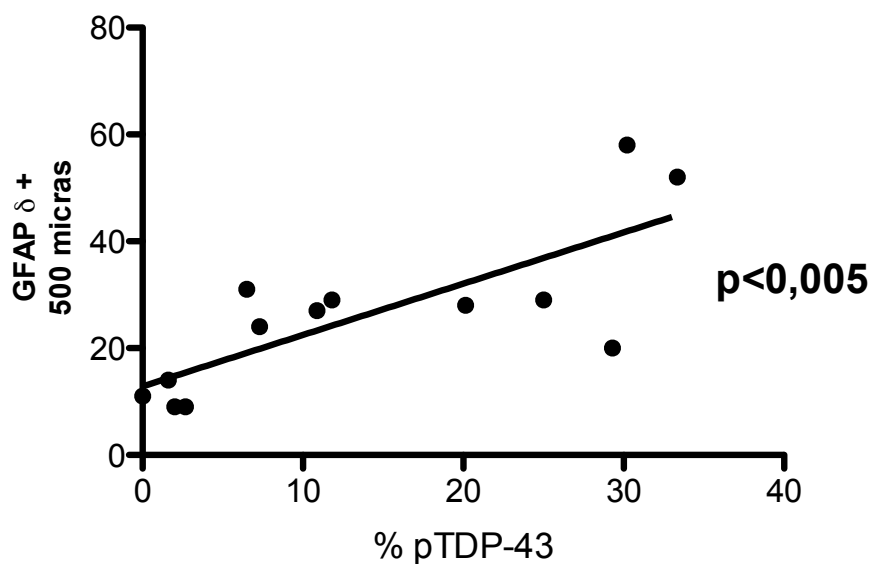


Gráfico 27: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y fosforilada y la cantidad de células neurales pluripotenciales marcadas con GFAPδ en la SVZ. Se observa la correlación entre la cantidad de células neurales pluripotenciales tipo C (GFAPδ+) y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada que es lineal y directa.

SVZ NEUROBLASTOS

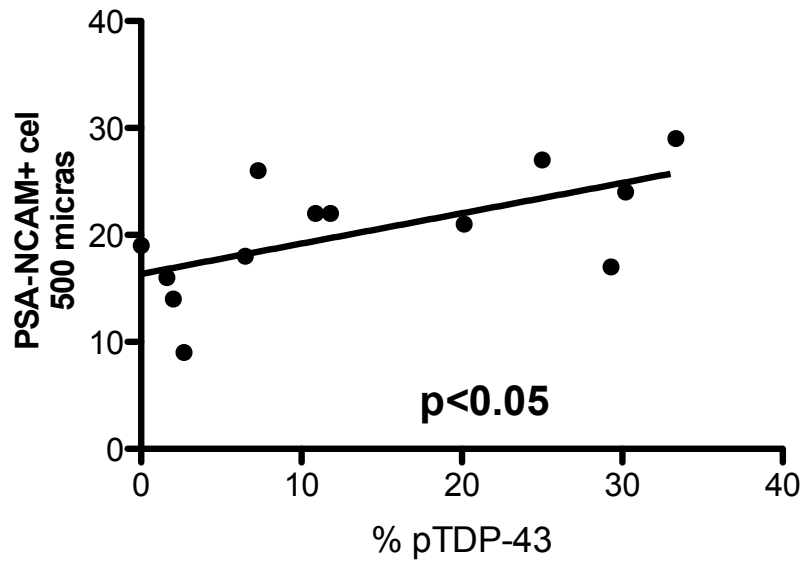


Gráfico 28: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos en la SVZ marcados con PSA-NCAM. Se observa la correlación entre la cantidad de neuroblastos, células tipo A (PSA-NCAM+) y el porcentaje de células TDP-43 fosforilada, esta correlación es lineal y directa.

SVZ NEUROBLASTOS

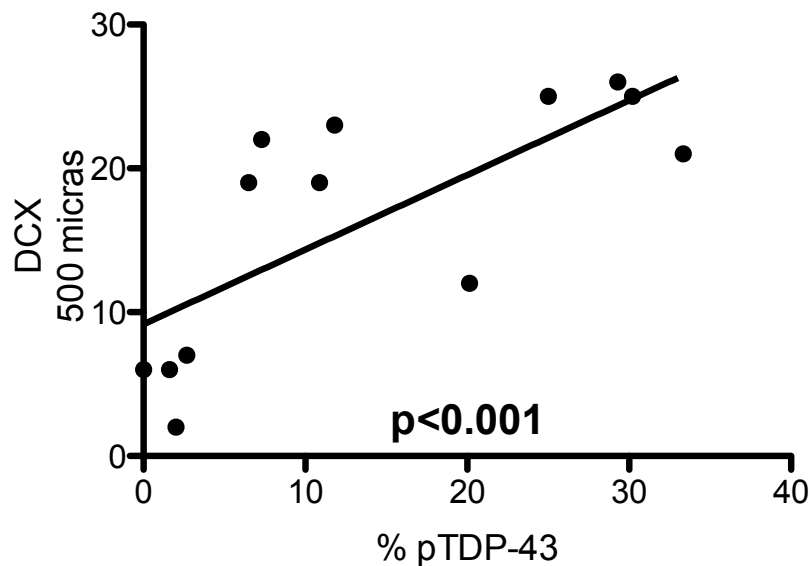


Gráfico 29: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos de la SVZ marcados con DCX. Se observa la correlación entre la cantidad de neuroblastos, células tipo A (DCX +) y el porcentaje de células TDP-43 citoplasmática. Esta correlación es lineal y directa.

VIII. c. 2. Estudio de la neurogénesis en el hipocampo

VIII. c. 2. a. Cambios de la estructura del nicho de la zona subgranular del giro dentado

Con respecto a los cambios morfológicos, no se encontraron alteraciones del tamaño de la capa subgranular en los pacientes con respecto a los controles.

VIII. c. 2. a. 1. Cambios de la composición celular de la zona subgranular del giro dentado

Se realizó la GFAP para valorar la presencia de astrocitos en el nicho de la zona subgranular del giro dentado. Los datos se expresan como número de células marcadas por cada 500µm. Se observó una astrocitosis en los pacientes con ELA en la SGZ con respecto a los controles (117,4 astrocitos \pm 26,24 vs. 32 \pm 5,03; $p=0,007$). Este aumento es significativo cuando se analizan de forma aislada los casos con ELA sin demencia (109,1 astrocitos \pm 23,19) frente a los controles (32 \pm 5,03); $p=0,01$. En el caso de los pacientes que asocian demencia a la ELA esta astrocitosis es mayor (146,5 astrocitos \pm 7,5), gráfico 30. No obstante dado el pequeño número de pacientes no es posible realizar un análisis estadístico fiable. A diferencia de lo ocurrido en la SVZ estos astrocitos no colocalizan con marcadores de proliferación células tipo 1, tipo A (células neurales progenitoras proliferativas) por lo que no parecen corresponder a células madre sino a una auténtica gliosis del nicho.

No existen diferencias significativas entre los pacientes con o sin tratamiento con riluzol (107,2 \pm 24,75 vs. 138 \pm 16,52; $p=0,092$) gráfico 31. Tampoco entre los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos (121,8 \pm 26,58 vs. 112 \pm 28,69; $p=0,623$), entre la forma de inicio bulbar o espinal (117,6 \pm 30,31 vs. 117,3 \pm 24,73, $p=0,902$) ni entre los pacientes según su sexo (mujeres 112,3 \pm 32,16 vs. hombres 121,6 \pm 23,52), $p=0,712$, gráficos en anexo de material suplementario.

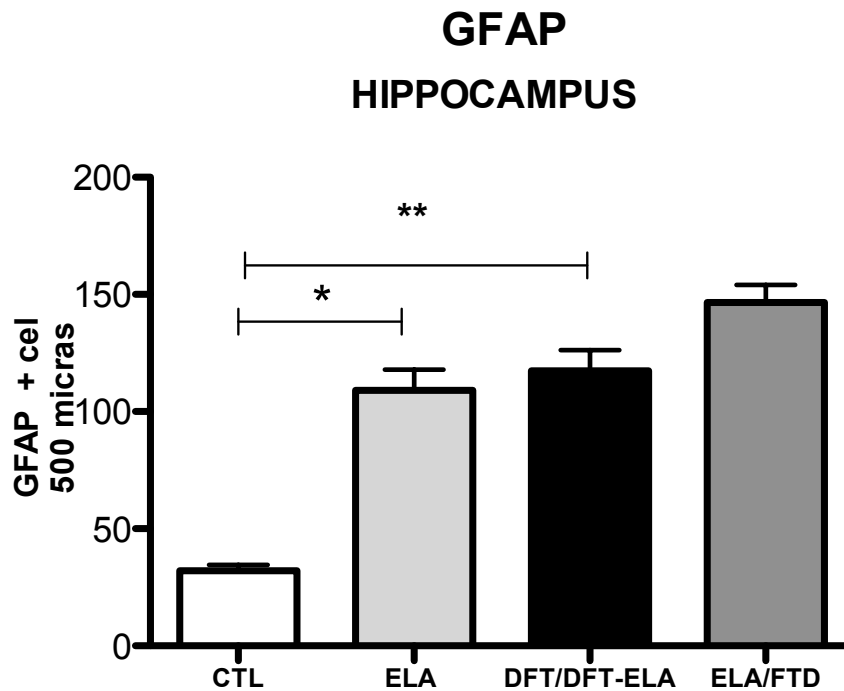


Gráfico 30: Estudio de las células marcadas con GFAP en la zona subgranular del hipocampo en pacientes y controles. Se observa el número de células positivas para GFAP (astrocitos) en la zona subgranular del giro dentado. Existe un aumento significativo entre los pacientes con ELA. Este aumento es mayor en los pacientes que asocian DFT.

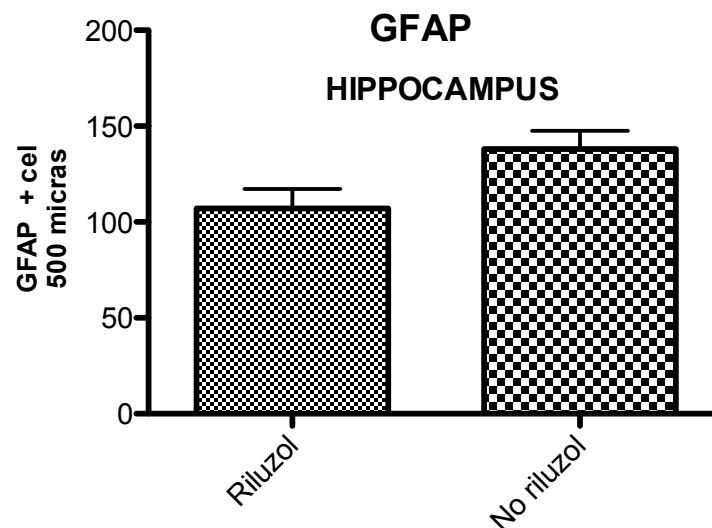


Gráfico 31: Número de células marcadas con GFAP en pacientes según el tratamiento recibido. No se observan diferencias significativas en la astrocitosis entre los pacientes tratados o no con riluzol.

Se realizó un estudio con inmunohistoquímica con el anticuerpo IBA-1 para valorar microglía. Con este anticuerpo se encuentra una reducción significativa de la cantidad de microglía (Controles $30,75 \pm 5,91$ vs. total de pacientes con ELA $17,89 \pm 3,7$; $p=0,009$). Sin embargo, en el caso de los controles todas las células eran de aspecto ramificado, mientras que en los pacientes con ELA con o sin demencia las células tenían un aspecto ameboide. El aspecto ameboide de la microglía se considera signo de activación de la misma. Esta reducción sigue siendo significativa cuando se consideran los casos de ELA sin DFT (Controles $30,75 \pm 5,91$ vs. ELA sin DFT $18,14 \pm 4,18$), $p=0,014$. Y la diferencia existe también cuando se consideran los pacientes con demencia frontotemporal (controles $30,75 \pm 5,91$ vs. ELA con DFT 17 ± 1) (Gráfico 32). No hay diferencias significativas entre los pacientes con o sin tratamiento con riluzol ($18,67 \pm 1,76$ vs. $16,22 \pm 0,88$; $p=0,407$) gráfico 33, los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos ($18,2 \pm 3,96$ vs. $17,50 \pm 3,87$; $p=0,806$; si la forma de inicio era bulbar frente a espinal ($16,80 \pm 1,30$ vs. $19,25 \pm 5,44$; $p=0,268$), ni con respecto al sexo (mujeres $17 \pm 0,70$ vs. hombres $18,6 \pm 4,9$), $p=0,539$, gráficos en anexo de material suplementario.

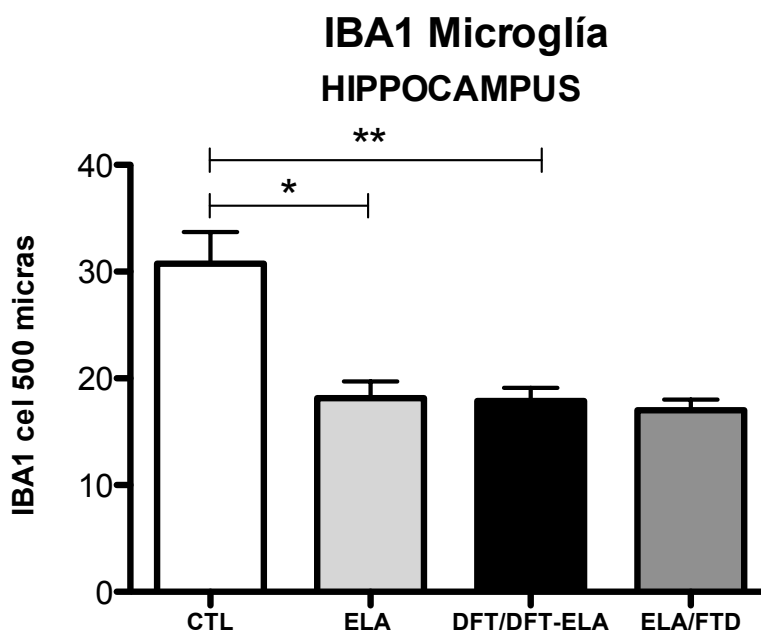


Gráfico 32: Microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes y controles. Con el marcador para la microglía IBA1 se encuentra una reducción significativa del número de células positivas para todos los pacientes con ELA.

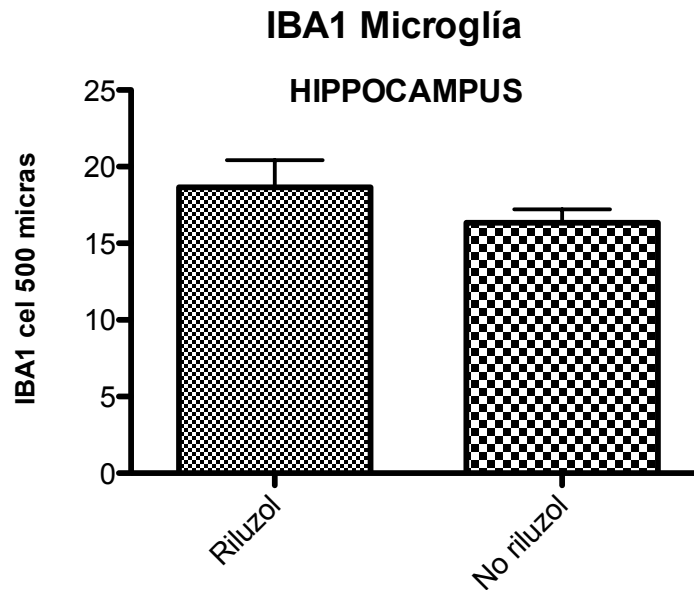


Gráfico 33: Microglía marcada con el marcador IBA-1 en la SGZ de los pacientes conforme al tratamiento recibido. No existen diferencias significativas en la cantidad de microglía marcada con IBA1 entre los pacientes con o sin tratamiento con riluzol.

VIII. c. 2. b. Estudio de la proliferación celular, células pluripotenciales, células 1, tipo A

Para el estudio de proliferación celular de las células pluripotenciales (tipo 1, tipo A) se utilizaron los marcadores PCNA, Ki67 y PHOS-H3. En todos ellos se observó en la SGZ del hipocampo una reducción significativa de la proliferación celular. Esta reducción es muy marcada para todos los casos, asocien o no demencia frontotemporal. La reducción es mucho más marcada que el aumento en el caso de la SVZ, de forma que la proliferación de estas células es prácticamente inexistente.

En el caso de la PCNA cuando se analizaron el número de células marcadas en 500 μm las diferencias entre los controles (4 células marcadas $\pm 1,41$) y los pacientes con ELA con o sin demencia frontotemporal (0,94 células $\pm 0,72$) eran significativas estadísticamente ($p=0,006$). Esta diferencia existe también entre los controles (4 células

marcadas $\pm 1,41$) y los pacientes sin DFT ($1,97 \pm 0,73$); $p=0,01$. En el caso de los pacientes con DFT asociada se encontraron escasísimas células marcadas con PCNA (Gráfico 34). No se encontraron diferencias entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol ($0,167 \pm 0,29$ células vs. $0,8 \pm 0,72$; $p=0,147$) gráfico 35, entre los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos y los que no ($0,5 \pm 0,5$ vs. $1,5 \pm 0,58$; $p=0,053$), los que presentaban una forma de inicio bulbar o espinal ($0,5 \pm 0,5$ vs. $0,8 \pm 1,58$; $p=0,053$), o según el sexo (mujeres $0,62 \pm 0,48$ vs. hombres $1,2 \pm 0,84$), $p=0,302$, gráficos en anexo.

En el caso del Ki67 cuando se analizaron el número de células marcadas en $500 \mu\text{m}$ las diferencias entre los controles ($3,25$ células marcadas $\pm 0,96$) y el total de los pacientes con ELA ($0,59$ células $\pm 0,66$) eran significativas ($p=0,008$). Esta reducción se mantenía también cuando se analizaba la diferencia entre los controles ($3,25$ células marcadas $\pm 0,96$) y los pacientes sin DFT ($0,75 \pm 0,66$); $p=0,01$. En el caso de los pacientes con DFT asociada no se encontró ninguna célula marcada con Ki67 (Gráfico 36). No se encontraron diferencias entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol ($0,167 \pm 0,29$ células vs. $0,8 \pm 0,72$; $p=0,147$) gráfico 37, entre los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos y los que no ($0,42 \pm 0,43$ vs. $0,80 \pm 0,91$; $p=0,617$) ; y los que presentaban una forma de inicio bulbar o espinal ($0,62 \pm 0,82$ vs. $0,55 \pm 0,53$; $p=0,9$), ni según el sexo (mujeres $0,78 \pm 0,86$ vs. hombres $0,44 \pm 0,52$), $p=0,707$) gráficos en anexo.

Cuando se analiza el PHOS-H3 como marcador de las células pluripotenciales tipo 1 o tipo A en fase de proliferación se encontró igualmente una reducción de las mismas en el total de pacientes con ELA con respecto a los controles (control $2,5 \pm 0,58$ vs. ELA con o sin DFT $0,29 \pm 0,29$, $p=0,006$). Existían asimismo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con ELA sin DFT ($0,37$ células $\pm 0,28$); $p=0,01$. En el caso de los pacientes con DFT y al igual que con el marcador Ki67, no se encontró ninguna célula pluripotencial tipo 1/tipo A en fase de proliferación (gráfico 38). No existían diferencias significativas entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol $0,35 \pm 0,30$ vs. $0,5 \pm 0,5$ ($p=0,416$), gráfico 39; asociaban síntomas neuropsiquiátricos o no ($0,24 \pm 0,34$

vs. $0,35 \pm 0,27$; $p=0,700$); presentaban una forma de inicio bulbar o espinal ($0,22 \pm 0,30$ vs. $0,37 \pm 0,30$; $p=0,521$) o según su sexo (mujeres $0,28 \pm 0,32$ vs. $0,3 \pm 0,31$, $p=1$). Gráficos en anexo de material suplementario.

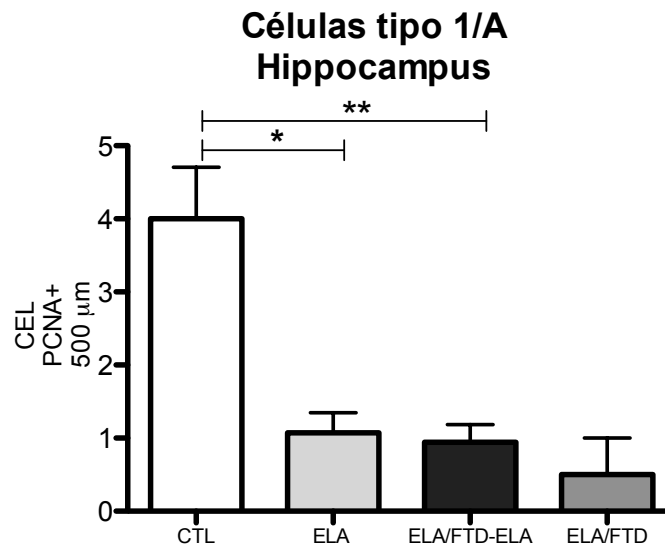


Gráfico 34: Células neurales progenitoras proliferativas (tipo 1, tipo A) marcadas con PCNA en la zona subgranular del giro dentado de controles y pacientes. Se observa una marcada reducción del número de células neurales progenitoras proliferativas tipo 1 marcadas con PCNA entre los pacientes con ELA y los controles.

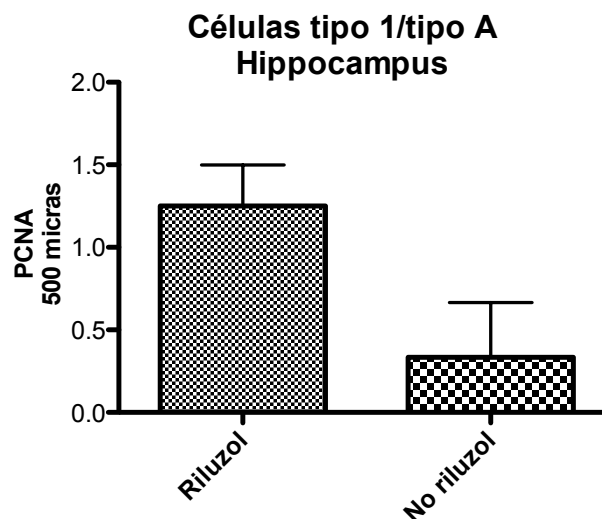


Gráfico 35: Células neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con PCNA en la SGZ de los pacientes según el tratamiento recibido. No se observan diferencias significativas en el número de células tipo 1 en la zona subgranular del giro dentado marcadas con PCNA entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol.

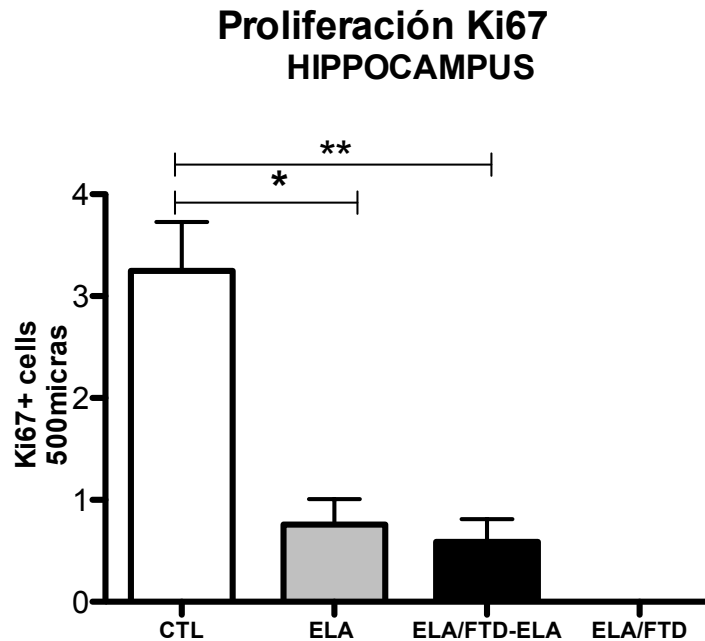


Gráfico 36: Células madre neurales progenitoras proliferativas (tipo 1/tipo A) marcadas con Ki67 en la SGZ del giro dentado de pacientes y controles. Se observa una marcada reducción de las células pluripotenciales (tipo 1/tipo A) en el GD de los pacientes con ELA que es significativa. En los dos casos con DFT no se encontró ninguna célula que marcarse para Ki67.

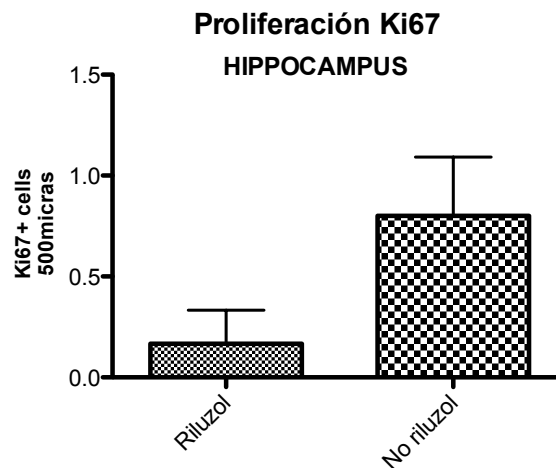


Gráfico 37: Células madre neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con Ki67 en la SGZ de pacientes según su tratamiento. No existen diferencias significativas entre la cantidad de células tipo 1 pluripotenciales entre los pacientes que recibían tratamiento o no tratamiento con riluzol.

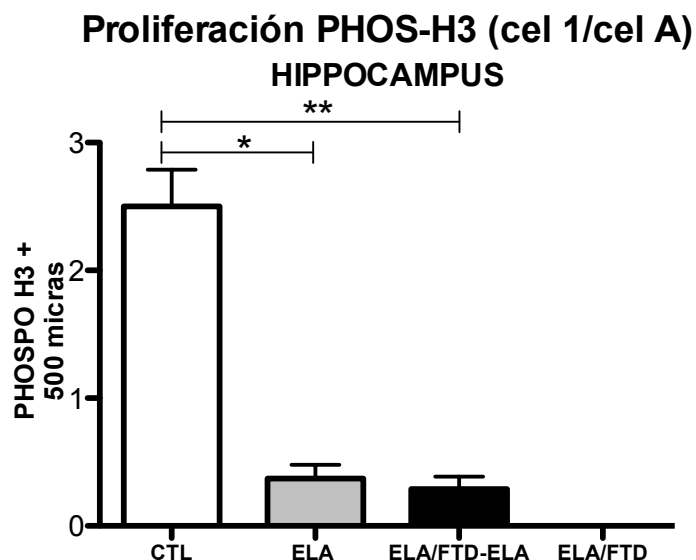


Gráfico 38: Células madre neurales progenitoras proliferativas (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona-3 en la SGZ del giro dentado de controles y pacientes. Cuando se marcan las células pluripotenciales tipo 1 en fase de proliferación se observa una marcada reducción de estas células en los pacientes con ELA, en los pacientes que asocian demencia frontotemporal no se encontraron células positivas para el marcador.

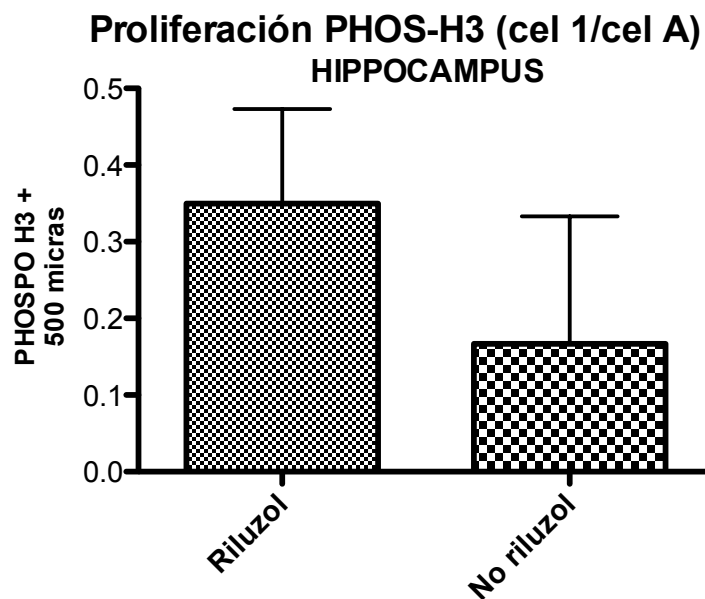


Gráfico 39: Células madre neurales progenitoras proliferativas tipo 1/tipo A marcadas con fosfohistona 3 en la SGZ del giro dentado de pacientes según el tratamiento recibido. No se encontraron diferencias significativas en la proliferación de las células pluripotenciales marcadas con fosfohistona 3 entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol.

VIII. c. 2. c. Estudio de la proliferación de las células neurales pluripotenciales (NPCs, células tipo 2, células tipo D1)

Para estudiar la proliferación de las células neurales pluripotenciales, NPCs, células tipo 2, tipo D1, se realizó el estudio con el marcador delta-GFAP, cuantificándose el número de células marcadas por 500µm. En este análisis se observa una reducción del número de células madre neurales NPCs en todos los pacientes con ELA con respecto a los controles (ELA total $2,35 \pm 1,8$ vs. control $11 \pm 3,16$, $p=0,007$). Cuando se analizan los controles frente a los casos de ELA sin DFT la reducción continúa siendo significativa (control $11 \pm 3,16$ vs. $0,257 \pm 0,751$; $p=0,01$)(gráfico 40, imagen 18). En el caso de los pacientes con demencia frontotemporal se observa una reducción aún mayor de la proliferación de las NPCs pero dado que sólo existen dos pacientes no se pudo afirmar de forma segura la significación estadística (control $11 \pm 3,16$ vs. $1,57 \pm 0,57$). Además de la diferencia cuantitativa, existe una diferencia en la morfología de las células, las células son más redondeadas, con escasas prolongaciones (imagen 18).

No se encontraron diferencias con este marcador entre los casos que recibían o no tratamiento con riluzol ($2,83 \pm 2,04$ vs. $1,38 \pm 0,66$; $p=0,362$) gráfico 41, los que presentaban síntomas neuropsiquiátricos frente a los que no ($2,83 \pm 2,15$ vs. $1,75 \pm 1,26$; $p=0,536$); las formas de inicio bulbar frente a las espinales ($2,43 \pm 2,07$ vs. $2,25 \pm 1,70$; $p=1$), ni por sexo (mujeres $2,79 \pm 2,20$ vs. $2 \pm 1,58$), $p=0,711$ gráficos en anexo de material suplementario.

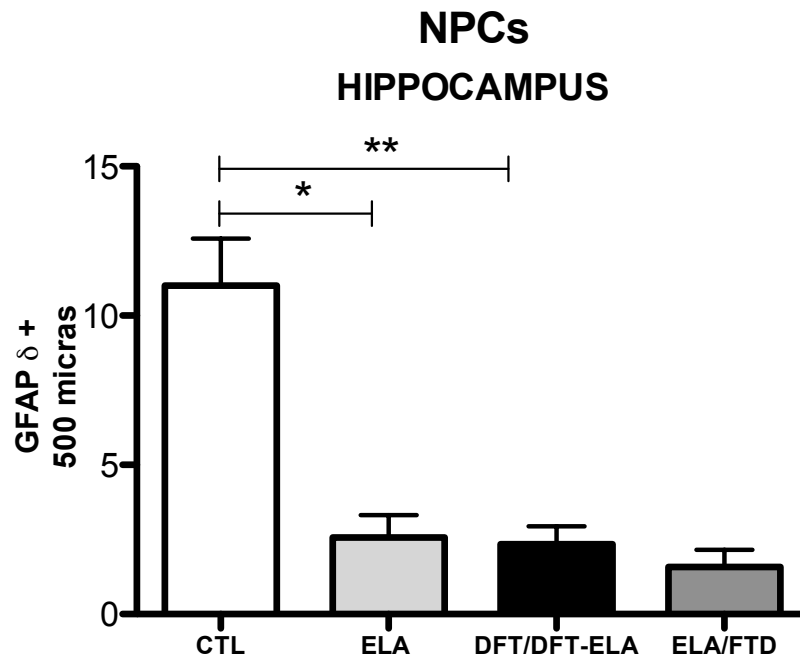


Gráfico 40: Estudio de las NPCs (células tipo 2/tipo D1) en la SGZ de pacientes y controles. Cuando se realiza el estudio de las NPCs, células tipo 2, con el marcador GFAP δ se observa una reducción para todos los casos de ELA frente a los controles.

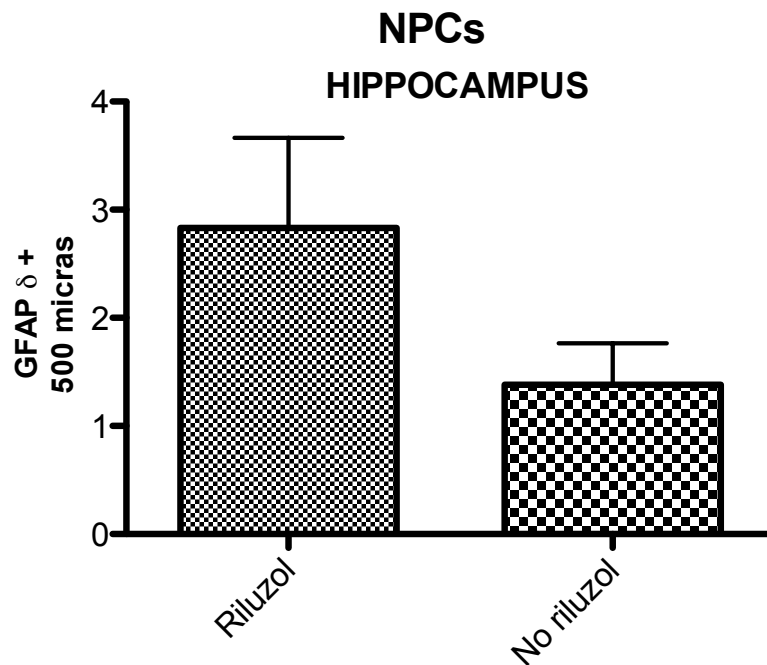


Gráfico 41: Estudio de las NPCs (células tipo 2/D1) con GFAP δ en la SGZ de pacientes conforme al tratamiento recibido. Cuando se realiza el estudio de las NPCs con el marcador GFAP δ no se observan diferencias significativas entre los pacientes tratados o no con riluzol.

HIPPOCAMPUS

GFAP- δ

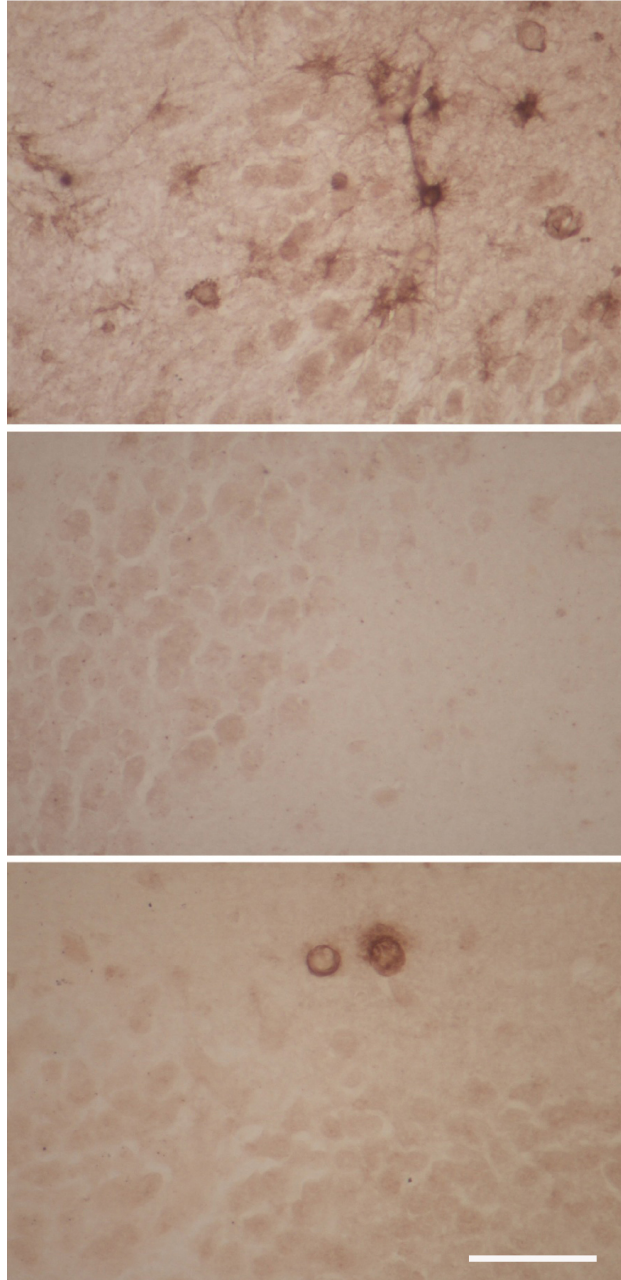


Imagen 18: La SGZ de los pacientes con ELA presenta una importante reducción de NPCs. En la imagen se observa un estudio con inmunohistoquímica contra GFAPdelta en visión directa. La imagen de la fila 1 corresponde al control, la imagen de la fila 2 a la paciente 1 ELA con DFT, la imagen 3 corresponde a un paciente con ELA sin DFT. Se aprecia una marcada reducción de los marcadores de células neurales pluripotenciales, así como una modificación de la morfología de las mismas con un menor número de prolongaciones. En el caso de los pacientes que asocian demencia frontotemporal la reducción es tan llamativa que en el campo observado no se encuentra ninguna de estas células. La barra corresponde a 25 μ m

VIII. c. 2. d. Estudio de la proliferación de los neuroblastos en la zona subgranular del giro dentado (células tipo 3, D3)

Para valorar el número de neuroblastos en la zona subgranular del giro dentado se utilizaron los marcadores PSA-NCAM y DCX (doblecortina) analizando campos de 500µm.

Cuando se analiza el marcador PSA-NCAM existe una marcada reducción en todos los casos de ELA, estén o no asociados a demencia, del número de neuroblastos frente a los controles (total de casos de ELA $0,79 \pm 0,85$ vs. controles $14,5 \pm 4,66$; $p=0.006$) (gráfico 42). Esta reducción es también significativa cuando se analizan solo los casos con ELA sin demencia ($1,01 \pm 0,84$ vs. controles $14,5 \pm 4,66$; $p=0,01$). La diferencia es mayor cuando se analizan los casos con DFT ($0,05 \pm 0,05$ vs. controles $14,5 \pm 4,66$) pero dado que sólo disponemos de dos pacientes con DFT no se puede afirmar su significación estadística o no. No existían diferencias entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol ($1,02 \pm 0,92$ vs. $0,33 \pm 0,58$; $p=0,336$) gráfico 43, los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos ($0,6 \pm 0,89$ vs. $1,03 \pm 0,86$; $p=0,434$), los pacientes con forma de inicio bulbar o espinal ($1,02 \pm 1,02$ vs. $0,5 \pm 0,58$; $p=0.515$), ni por el sexo (mujeres $1,28 \pm 0,98$ vs. hombres $0,4 \pm 0,55$), $p=0,193$, gráficos en anexo.

En el estudio con doblecortina el marcaje aparecía apenas en los procesos neuronales pero no en el cuerpo, por lo que no era posible realizar una cuantificación del mismo. No obstante, desde un punto de vista visual el marcaje era inferior en los pacientes con ELA que en los controles (imagen 19). Esto mismo ocurrió para el marcador Tuj-1.

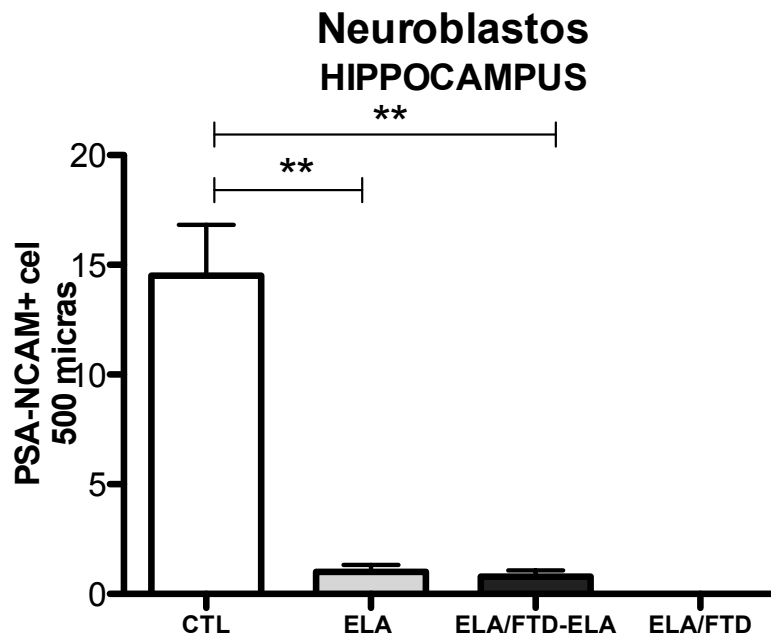


Gráfico 42: Neuroblastos (células tipo 3/ D3) marcados con PSA-NCAM en la zona subgranular de pacientes y controles. Se observa una reducción significativa en el número de neuroblastos marcados por la PSA-NCAM entre los pacientes con ELA y los controles.

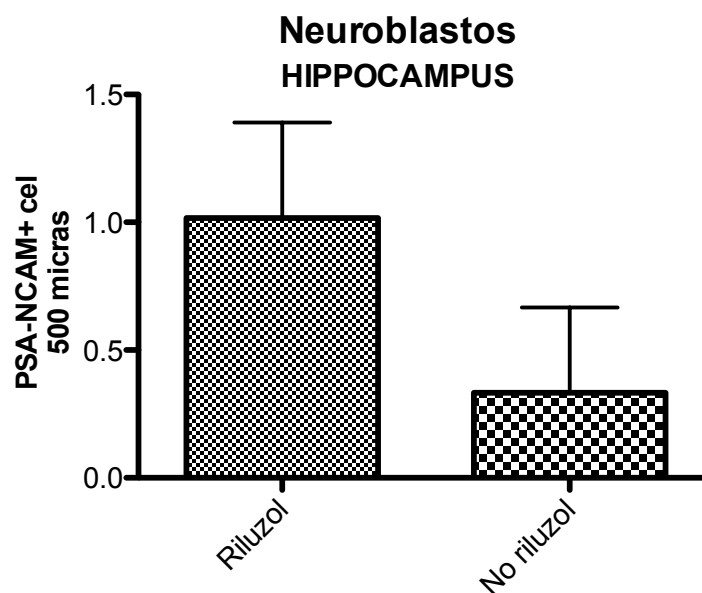


Gráfico 43: Neuroblastos (células tipo 3/tipoD3) en la zona subgranular de pacientes según su tratamiento. Cuando se analiza el número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM no hay diferencias significativas entre los pacientes que recibían o no tratamiento con riluzol.

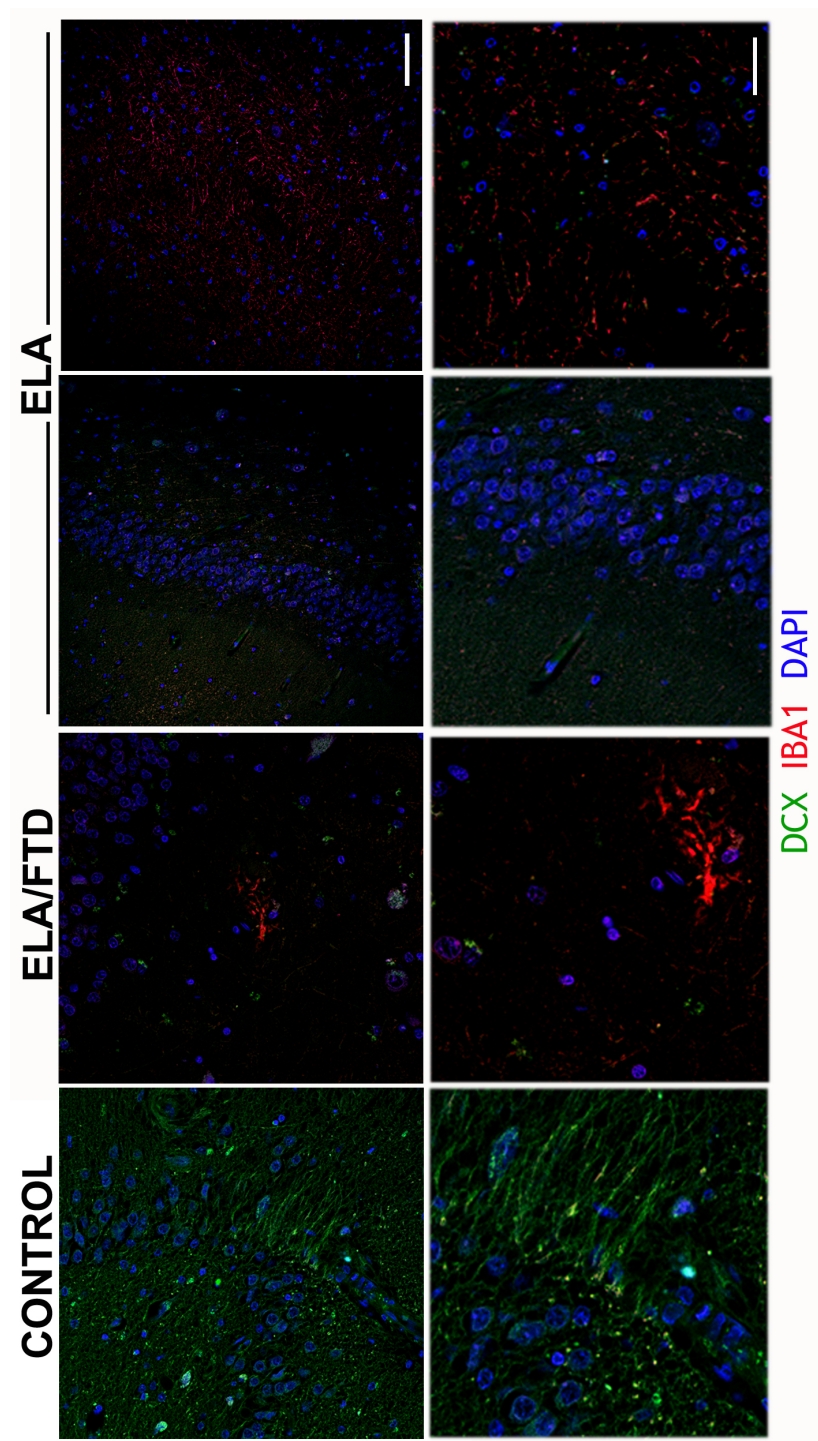


Imagen 19: En la SGZ de los pacientes con ELA existe una importante reducción de neuroblastos. Se observa la marcada reducción de neuroblastos (con el anticuerpo doblecortina) tanto en los casos asociados a DFT, como en los casos aislados. Igualmente se observa que la microglía presenta un aspecto diferente con respecto a los controles, de forma que el marcador da una falsa imagen de aumento del número de células.

Tabla 7: Resumen de resultados en el hipocampo

		CONTROL	TOTAL ELA	P	ELA SIN DFT	P
Estructura	Astrocitos GFAP	32+/-5,03	117,40+/-26,24	0,01	109+/-23,19	0,01
	Microglía IBA1 Ramificada Ameboide	30,75+/-5,91	17,89+/-3,7	0,01	18,4+/-4,18 Ameboide	0,01
Proliferación	PCNA	4+/-1,41	0,94+/-0,72	0,01	1,97+/-0,73	0,01
	Ki67	3,25+/-0,96	0,59+/-0,66	0,01	0,75+/-0,66	0,01
	Phos-H3	2,5+/-0,58	0,29+/-0,29	0,01	0,37+/-0,28	0,01
NPCs	GFAP δ	11+/-3,16	2,35+/-1,8	0,01	2,57+/-0,75	0,004
Neuroblastos	PSA-NCAM	14,5+/-4,66	0,79+/-0,85	0,01	1,01+/-0,84	0,01

Se considera significativo $p < 0,05$

VIII. c. 2. e. Estudio de la correlación de la neurogénesis en hipocampo con otras variables

Cuando se analizó la correlación del porcentaje de TDP-43 citoplasmática fosforilada con respecto a las diferentes variables, se encontró nuevamente que esta se correlaciona de forma estadísticamente significativa para la mayor parte de ellas.

Con respecto a la morfología del nicho se encontró que existe una correlación lineal y directa del porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática con la gliosis de la zona subgranular del giro dentado $p < 0,0001$ (gráfico 44). En el caso de la correlación con la cantidad de microglía en este caso la correlación es nuevamente lineal pero inversa ($p < 0,0001$), gráfico 45.

Con respecto a la proliferación de las células neurales progenitoras proliferativas, tipo 1/tipo A, cuando se analiza el PCNA se observa que existe una correlación inversa y

exponencial ($p < 0,0001$), gráfico 46. Este mismo tipo de correlación se observa cuando se utilizan como marcador Ki-67 ($p < 0,0001$), gráfico 47 o PHOS-H3, gráfico 48 ($p < 0,0001$).

Cuando estudiamos el estadio de células tipo 2/tipo D1, NPCs, con GFAP δ , vemos que la correlación es también negativa y exponencial, gráfico 49 ($p = 0,0024$).

Por último, cuando estudiamos los neuroblastos con PSA-NCAM encontramos también una correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y el número de neuroblastos, células tipo 3/tipo D3, que es inversa y exponencial ($p = 0,004$), gráfico 50.

No existía correlación de ninguna de los resultados de la neurogénesis con la TDP-43 total ni con la edad de los pacientes.

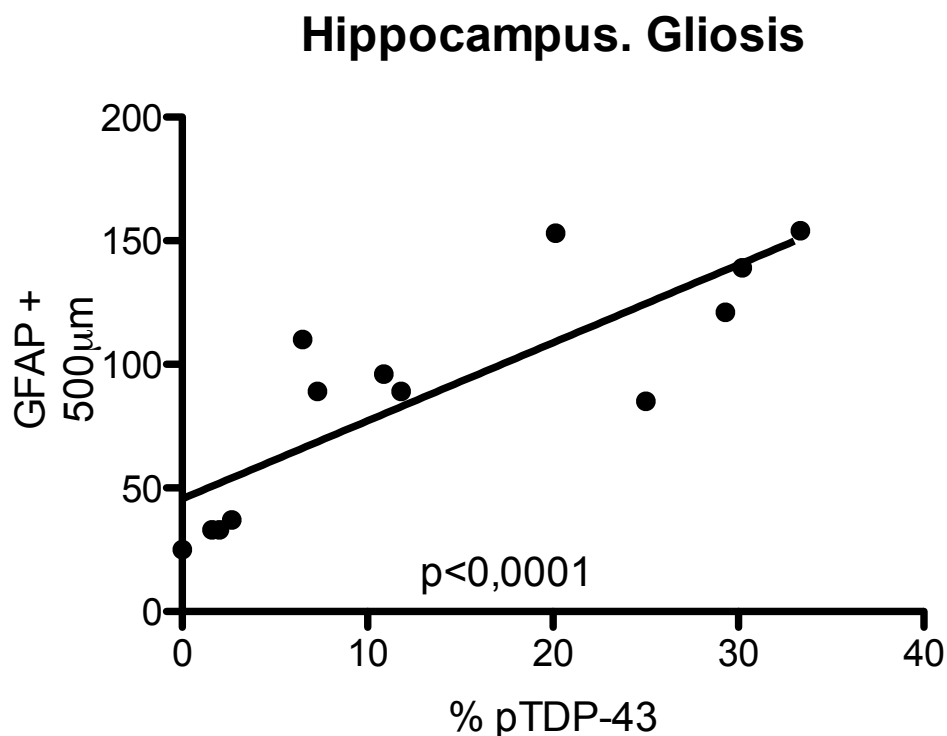


Gráfico 44: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y citoplasmática y las células marcadas con GFAP en la SGZ del giro dentado. Se observa una correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y la gliosis. Esta correlación es lineal y directa.

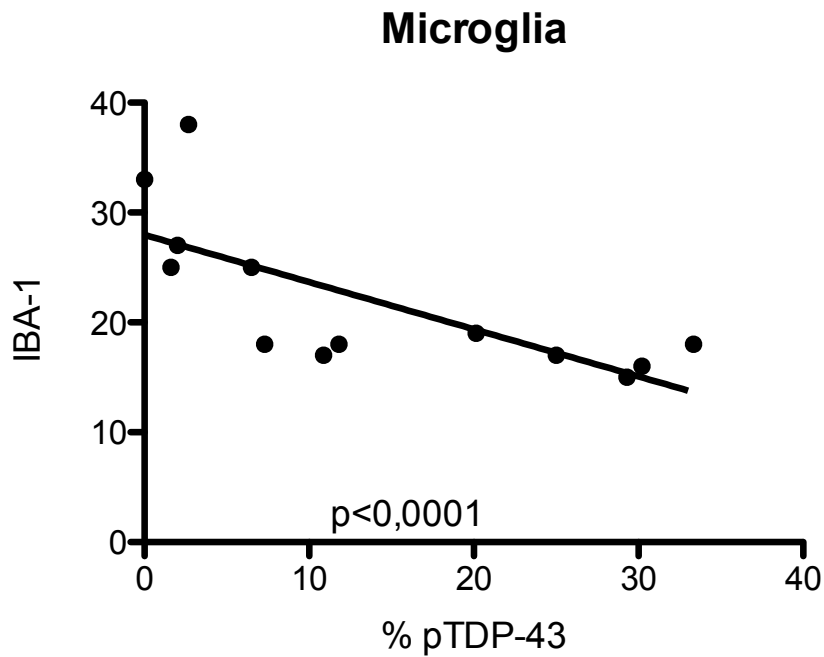


Gráfico 45: Correlación entre la cantidad de microglía y el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática de la SGZ. Se observa una correlación inversa entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada y la cantidad de microglía en la zona subgranular del giro dentado.

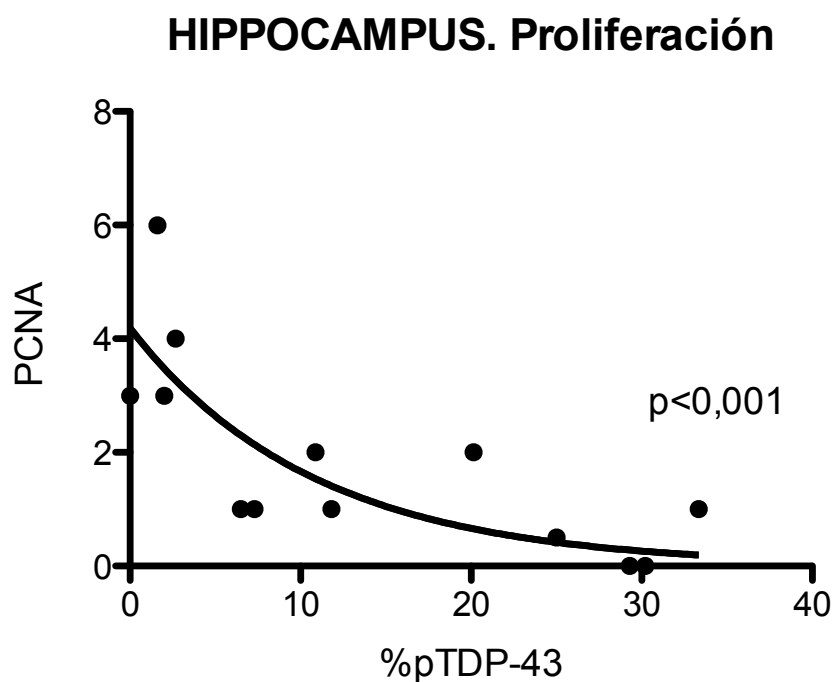


Gráfico 46: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada en el citoplasma y las células tipo 1/tipo A marcadas con PCNA en la SGZ. Se observa una relación inversa y exponencial entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y la proliferación de células tipo 1 observada con PCNA.

HIPPOCAMPUS

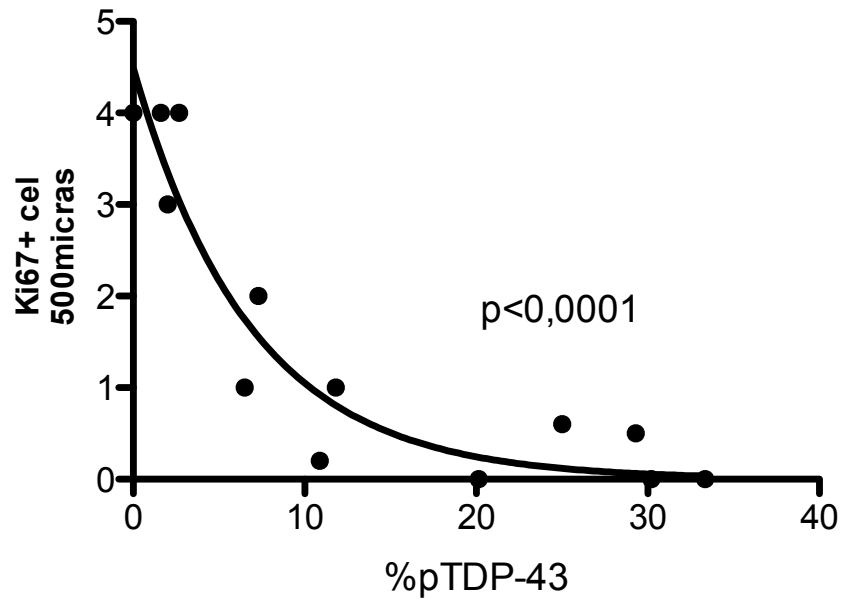


Gráfico 47: Correlación entre el número de células tipo 1/tipo A marcadas con Ki-67 en la SGZ del giro dentado y el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática. Se observa una correlación inversa y exponencial entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y la proliferación de células tipo 1/tipo A marcadas con Ki-67.

HIPPOCAMPUS

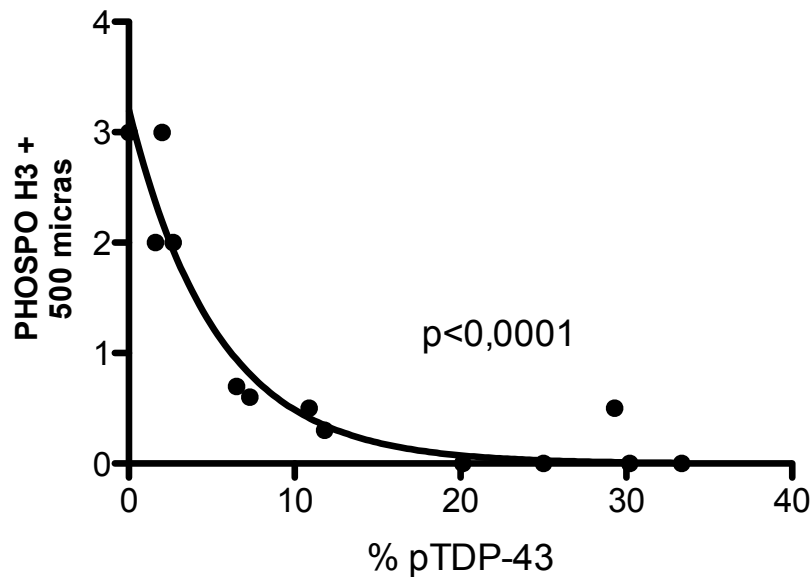


Gráfico 48: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de células tipo 1/tipo A marcadas con fosfohistona 3. Se observa una correlación inversa y exponencial entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y la proliferación de células tipo 1/tipo A marcadas con PHOS-H3.

Hippocampus. NPCs

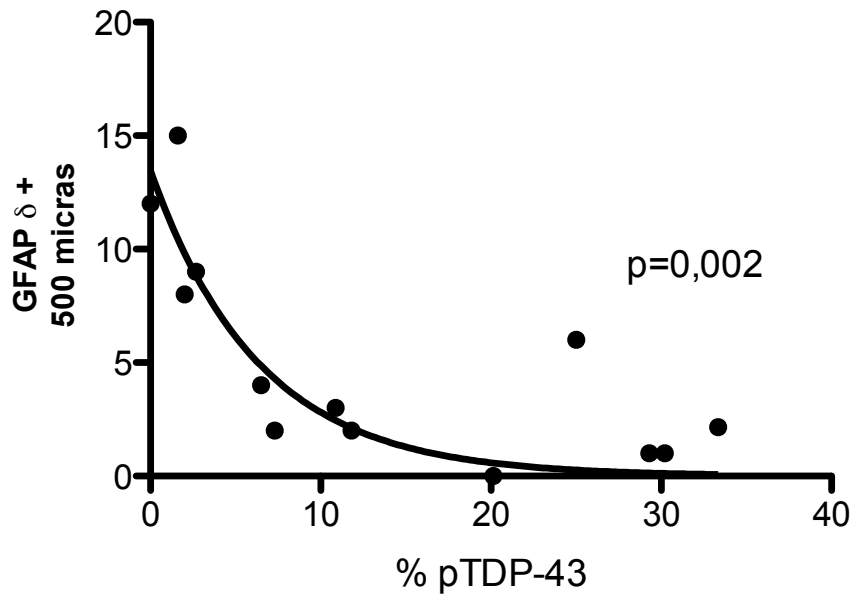


Gráfico 49: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de NPCs (células tipo 2/tipo D1) de la SGZ del hipocampo. Se observa una correlación inversa y exponencial entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y la proliferación de células tipo 2/tipo D1 marcadas con GFAP δ .

Hippocampus. Neuroblastos

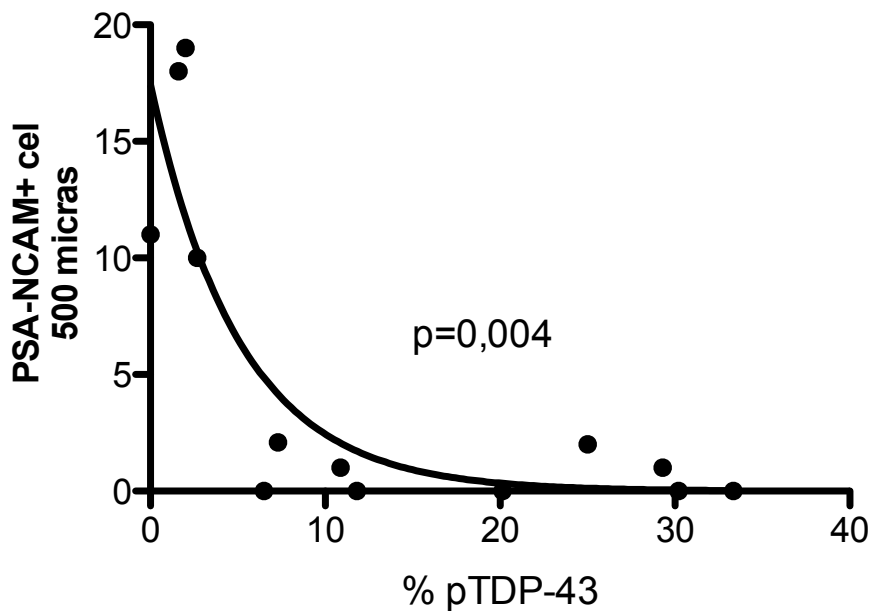


Gráfico 50: Correlación entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y el número de neuroblastos (células tipo 3/tipo D3) marcadas con PSA-NCAM. Cuando se estudia la relación entre los neuroblastos (PSA-NCAM) y el porcentaje de TDP-43 fosforilada se observa que esta es inversa y exponencial.

VIII. d. Estudio de neurogénesis por microscopía electrónica

Se realizó el estudio de la organización morfológica de ambos nichos neurogénicos con microscopía electrónica en los pacientes con ELA asociada o no a demencia frontotemporal comparado con los controles. En el caso de la SVZ no se encontraron alteraciones de la zona endimaria, en todos los casos con ELA asociada o no DFT se encontró un aumento considerable del tamaño de la capa hipocelular (*GAP*) y de la capa astrocitaria. En la capa hipocelular se observaron abundantes cuerpos celulares que estructuralmente correspondían a astrocitos de gran citoplasma, grandes expansiones, abundantes organelas y numerosos filamentos intermedios. Se encontraron además células picnóticas y células de microglía con abundantes vesículas y cuerpos amiloides. En el caso de la zona subgranular no se encontró modificación del tamaño de la misma. En este caso se encontraron numerosos astrocitos, pero el aspecto de los mismos era diferente presentando un menor número de organelas y de filamentos intermedios y un menor tamaño del citoplasma. Se observó además una microglía de aspecto redondeado con abundantes vesículas y cuerpos de amiloide. Estos hallazgos confirman lo encontrado en la inmunohistoquímica.

VIII. e. Resumen de resultados

En resumen, en el presente estudio se observa en las necropsias de pacientes con ELA una modificación de la neurogénesis en ambos nichos (zona subventricular y zona subgranular del giro dentado), imágenes 21 y 22. Esta reducción afecta a los dos nichos neurogénicos de forma opuesta:

- En la SVZ se produce un aumento de la proliferación en todas las fases de la misma (células pluripotenciales proliferativas -tipo B-, células neurales pluripotenciales -tipo C- y neuroblastos -tipo A-), por tanto con una diferenciación neuronal, imagen 21.
- En la zona subgranular del giro dentado se produce una reducción marcada de la proliferación de las células en todas sus fases (células madre pluripotenciales

proliferativas -tipo 1/tipo A-, células neurales pluripotenciales -tipo 2/tipo D1- y neuroblastos -tipo 3/tipoD3-), imagen 22.

En ambos casos la modificación parece ser más marcada en los pacientes que asocian demencia frontotemporal, pero dado que la muestra de pacientes con ELA y DFT era de dos individuos no fue posible determinar si esta diferencia era estadísticamente significativa.

Existe además una modificación de la estructura de ambos nichos, en ambos existe una astrocitosis significativa con respecto a los controles. En el caso de la SVZ existe además un aumento significativo del tamaño de la capa hipocelular (*GAP*) y del tamaño de la capa (*ribbon*), imagen 21.

Por último encontramos una correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática y las alteraciones de la neurogénesis. Esta correlación es lineal y directa para la SVZ (a mayor porcentaje de TDP-43 citoplasmática mayor incremento de la neurogénesis) y exponencial e inversa para la capa subgranular del GD (a mayor porcentaje de TDP-43 fosforilada citoplasmática mayor reducción de la neurogénesis).

IX. DISCUSIÓN

IX.a. Esclerosis lateral amiotrófica y Neurogénesis

Se conoce muy poco sobre la neurogénesis en la esclerosis lateral amiotrófica. Clásicamente se consideraba que los síntomas propios de la alteración de la neurogénesis (pérdida del olfato, cambios en el carácter) no aparecían en esta enfermedad. Sin embargo hoy se sabe que un gran número de pacientes presentan cambios en el carácter (Kasper *et al.* 2015, Goldstein y Abrahams 2013), apatía (Radakovic *et al.* 2015) y modificaciones de la inteligencia social (Cerami *et al.* 2014), estos aparecen hasta en un 30% de los pacientes.

En los últimos años se ha encontrado que además algunos de los pacientes con ELA presentan alteraciones en el olfato, aunque generalmente pasan desapercibidas. Estos trastornos se relacionan con modificaciones de la personalidad (Ward *et al.* 2014). Ya se habían encontrado previamente estas alteraciones del olfato en los casos de ELA asociadas a parkinsonismo de la Isla de Guam (Ahlskog *et al.* 1998) e incluso en los ratones que se exponen a la toxina cicad, que se ha considerado responsable de esta forma particular de la enfermedad (Kisby *et al.* 2011). Se ha publicado un caso único de una paciente que comenzó su clínica por síntomas olfatorios llegando a consultar por ellos, para después desarrollar síntomas de ELA sin deterioro cognitivo. En su autopsia se observaron inclusiones TDP43 positivas (Takeda *et al.* 2014).

IX.a.1. Neurogénesis en los modelos experimentales de ELA

Existen pocos estudios sobre la neurogénesis en los modelos animales de ELA y la mayor parte de ellos estudian la neurogénesis en los modelos ratones transgénicos para mutaciones humanas en la *SOD1*. La mayoría de estos estudios se centran en las modificaciones del nicho central medular. El primer estudio sobre ELA y neurogénesis encontraba un aumento de las neuronas recién formadas en el ratón transgénico para mutaciones humanas de la *SOD1*, este aumento no ocurría en los ratones controles. Este incremento de neuronas se debía a un aumento de la supervivencia de las nuevas neuronas que era muy precoz y ocurría antes del inicio de los síntomas y antes incluso de que existiese una pérdida de neuronas motoras significativa (Warita *et al.* 2001).

Posteriormente, se publicó otro estudio que utilizaba una combinación de ratón transgénico para la *SOD1* y ratón transgénico para la nestina (Chi *et al.* 2006). Este estudio observó un aumento de la proliferación de las NPCs, células tipo B, localizado en el nicho medular central a nivel lumbar. Cuando se inicia la enfermedad estas células migran al asta posterior medular, y de ahí algunas al asta anterior, aunque curiosamente la migración parece ser mayor al asta posterior. Los autores discuten que este patrón de migración es diferente al que presentan los ratones sanos durante la embriogénesis, por lo que especulan que el propio patrón de migración pueda verse modificado por la enfermedad. Estos investigadores no detectaron un aumento de la neurogénesis, ni de la gliogénesis previo al inicio de la enfermedad, el incremento aparecía coincidiendo con el inicio de la misma. Por lo que se especula que este incremento de la neurogénesis tenga un objetivo reparador (Chi *et al.* 2006). De hecho los autores hallaron que algunas de las nuevas neuronas migran a la vecindad de neuronas que están degenerando. No se describe en el artículo si estudiaron otros nichos neurogénicos u otras zonas medulares. Sin embargo, los mismos autores un año mas tarde realizan un experimento similar en el que se analiza el córtex motor, la zona ventricular (SVZ) y el hipocampo. En este estudio se describe un incremento de las NPCs en el córtex motor al inicio de la enfermedad pero no cuando esta progresa, una reducción de la neurogénesis en la SVZ con la progresión de la enfermedad y no demostraron

modificaciones en ningún momento en el hipocampo (Chi *et al.* 2007). Por último, otros autores encontraron apenas un aumento de la gliogénesis sin aumento de la neurogénesis en la médula del ratón transgénico (Guan *et al.* 2007).

En resumen el estudio de la neurogénesis en los modelos experimentales de ELA ofrece resultados contradictorios. La mayor parte de los autores describen un aumento de la neurogénesis en el nicho central medular que es precoz (para algunos autores ocurre previo a los síntomas y para otros justo al inicio de los mismos). Sin embargo incluso para este nicho algunos autores no encuentran modificaciones. Sólo un estudio se centra en los nichos neurogénicos clásicos y observa una reducción en la SVZ sin modificaciones en la zona subgranular del giro dentado. El resumen de estos estudios se recoge en la tabla 8 .

Tabla 8: Neurogénesis en los modelos experimentales de ELA.

Zona central medular	SVZ	SGZ
Warita <i>et al.</i> 2001 aumento previo al inicio de los síntomas	Chi <i>et al</i> 2007 aumento	Chi <i>et al.</i> 2007 No modificación
Chi <i>et al.</i> 2006 aumento al inicio de los síntomas, pero no previo		
Guan <i>et al.</i> 2007 Gliogénesis		

IX.a.2 Neurogénesis y tratamiento de la ELA

Existen muy pocos estudios de la neurogénesis y la ELA. La posibilidad de que la estimulación de la neurogénesis sea una posible diana terapéutica está poco explorada. Sin embargo, aunque es un estudio general y no aplicado a la enfermedad, conviene comentar un trabajo muy interesante sobre la neurogénesis en el hipocampo y el uso del Riluzol. El Riluzol es el único tratamiento aprobado para la enfermedad y cuyo mecanismo de acción no se conoce bien (Bellingham 2011). Se sabía que entre los efectos del riluzol se encontraba el aumento de la producción endógena de BDNF (Mizuta *et al.* 2001) y en esta publicación (Katoh-Semba *et al.* 2002), se observó que tras una única administración de riluzol intraperitoneal en ratas se producía un aumento de la proliferación en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, de forma que muchas de las células formadas se diferenciaban a neuronas y sobrevivían, mientras que si se administraban de forma intraventricular bloqueantes del BDNF no se producía este efecto.

Igualmente la minociclina parece tener un papel importante favoreciendo la neurogénesis (Mattei *et al.* 2014, Kumar *et al.* 2015). Este fármaco había presentado muy buenos resultados cuando se ensayó en el modelo animal transgénico para mutaciones en la *SOD1* (Kong *et al.* 2012), pero en el ensayo clínico en humanos empeoraba la evolución de la enfermedad (Gordon *et al.* 2007).

El litio es otro fármaco que podría actuar sobre la neurogénesis aumentándola (Hanson *et al.* 2011). Las vías que se han implicado en la acción de este fármaco (la GSK3B y la autofagia) también parecen jugar un papel en la neurogénesis (Nadri *et al.* 2004, Chung y Yu 2013). Pero, de nuevo, este fármaco no fue efectivo cuando se ensayó en pacientes (Morrison *et al.* 2013).

Otro medicamento que se encuentra en la misma situación es la memantina, de nuevo este fármaco incrementa el número de NPCs (Namba *et al.* 2009) pero aunque se ensayó en pacientes con ELA no se encontró ningún efecto. También se ha intentado el tratamiento con BDNF y otros factores neutróficos aunque sin resultados (Nagahara y Tuszynski 2011).

IX.a.3. Neurogénesis adulta en la ELA en el humano

La única descripción en necropsia de humanos del estado de la neurogénesis en una paciente con ELA fue realizada por este equipo y es uno de los casos que conforman esta tesis (Galan *et al.* 2011). Previamente Takeda había descrito modificaciones histológicas en la zona subgranular del giro dentado con atrofia del hipocampo en los pacientes con ELA particularmente en aquellos con alteraciones cognitivas (Takeda *et al.* 2009), pero no se realizó un análisis de la neurogénesis en esa zona. Un estudio reciente ha encontrado reducción en el volumen del hipocampo medido con RM en aquellos pacientes de ELA que presentaban déficit de memoria recitativa sin demencia (Raaphorst *et al.* 2015). Algún grupo incluso ha encontrado alteraciones similares a las encontradas en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (Smitt *et al.* 1993). No existen descripciones de cambios en la zona subventricular en este tipo de pacientes ni por pruebas de neuroimagen ni por anatomía patológica.

Con respecto al nicho medular tampoco existen estudios en pacientes. Nuestro grupo publicó como parte de un artículo de anatomía comparativa del nicho medular en humano, mono y ratón, dos casos de ELA (los casos 1 y 7 de esta serie) en los que el nicho parece tener cambios morfológicos (está colapsado) y presenta una mayor neurogénesis. Sin embargo dado el escaso número de pacientes no fue posible realizar un estudio estadístico. (Imagen 20)

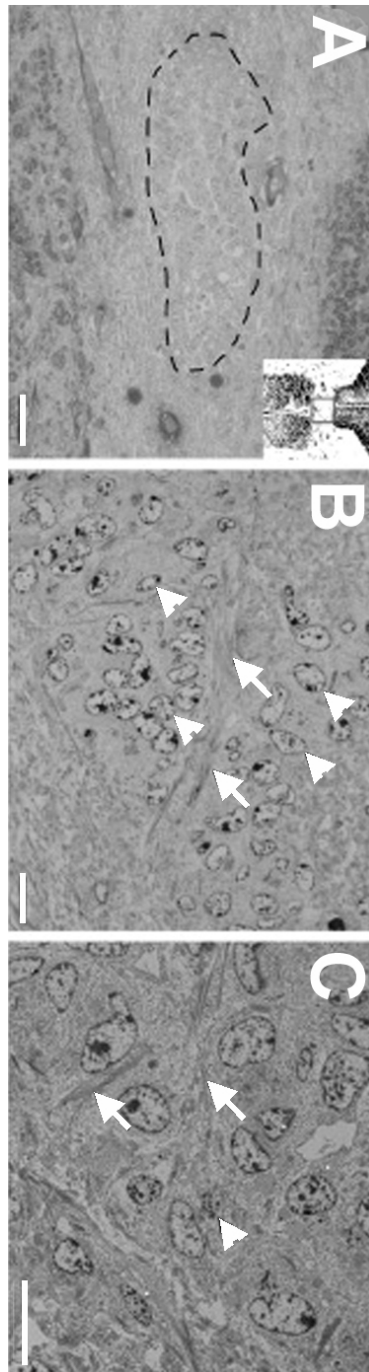


Imagen 20: Aspecto del nicho medular en uno de los pacientes del estudio. El nicho medular central aparece obliterado en el humano cuando se observa con la tinción azul de toluidina (A). A mayor aumento se observa una capa acelular entre las células ependimarias (B). En el estudio de microscopía electrónica se observan abundantes filamentos entre las células ependimarias. La barra equivale a 25 μm en A y a 50 μm en B y C.

IX. b. Los nichos neurogénicos clásicos responden de forma diferente en la esclerosis lateral amiotrófica

En nuestro estudio encontramos que de forma consistente existe una respuesta divergente de los nichos neurogénicos en la necropsia de pacientes con ELA. En el caso de las SVZ se produce un aumento significativo de todos los tipos celulares (células pluripotenciales tipo A, células neurales pluripotenciales NPCs tipo B y neuroblastos tipo C), es decir se produce un aumento de la neurogénesis con diferenciación neuronal. En el caso de la zona subgranular del giro dentado encontramos una marcadísima reducción de todos ellos (células pluripotenciales tipo A, células neurales pluripotenciales tipo B y neuroblastos tipo C). (imagen 21) Tanto en el caso de la SVZ como en el GD el cambio es más extremo si se asocia demencia frontotemporal a la clínica de neurona motora.

Esta forma diferente de responder los dos nichos ante la misma patología no es la característica de las otras enfermedades neurodegenerativas, en las que ambos nichos parecen estar reducidos. La única excepción a esto es la enfermedad de Huntington, en la que los estudios arrojan resultados contradictorios pero algunos autores encuentran un patrón de respuesta similar (aumento de la proliferación en la SVZ sin modificación de la neurogénesis en la zona subgranular del GD) (Winner y Winkler 2015).

Esta respuesta diferente de ambos nichos podría apoyar que su función diferente, al menos ante situaciones patológicas (Kaneko y Sawamoto 2009). La respuesta de proliferación de las SVZ respalda su posible papel restaurador. Es decir ante agresiones diversas o neurodegeneración la SVZ responde aumentando el número de nuevas neuronas disponibles. Este tipo de respuesta se ha encontrado en el ictus (Barkho y Zhao 2011). El hecho de que encontremos además una correlación con el porcentaje de TDP-43 fosforilada y citoplasmática podría corresponderse a un efecto de mayor respuesta en los casos en que la enfermedad está más extendida y por tanto, apoya el potencial papel restaurador de la neurogénesis a ese nivel.

Resulta más difícil de explicar la marcada reducción de la neurogénesis en la zona

subgranular del giro dentado (Kempermann *et al.* 2015). Clásicamente se ha implicado a este nicho en funciones de consolidación de la memoria. En este sentido sería lógico encontrar la reducción de la neurogénesis en el GD en los pacientes con demencia frontotemporal. Sin embargo, aunque es cierto que estos pacientes parecen presentar una mayor reducción de la neurogénesis, todos los casos de ELA independientemente de su afectación cognitiva, presenta una reducción de la misma.

Puesto que algunos autores han considerado que la reducción de la neurogénesis del adulto puede jugar un papel en las enfermedades neurodegenerativas, y que esta reducción es la causa de las alteraciones neuropsiquiátricas deberíamos encontrar que la reducción es mayor en los pacientes que presentan este tipo de síntomas, sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con síntomas neuropsiquiátricos o sin ellos. Es cierto, que la presencia o ausencia de estos síntomas se recogía conforme a lo registrado en la historia clínica, y que, con excepción de la presencia de depresión (que se incluye en la vía clínica de seguimiento de los pacientes de las unidades de ELA de la Comunidad de Madrid) (Rodríguez de Rivera *et al.* 2007), no existe un cuestionario estructurado en las historias clínicas de los pacientes. Igualmente, hasta la fecha, la evaluación neuropsicológica reglada no se realiza de rutina de estos pacientes en nuestro centro. Para intentar paliar estas deficiencias se realizó a los familiares de los pacientes una encuesta que incluía varios ítems relacionados con alteraciones cognitivas de la memoria y del comportamiento, pero no se encontró ningún resultado diferente a los previamente encontrados en la historia de los pacientes. Por otro lado, la presencia de alteraciones en el hipocampo de los pacientes con ELA sobre todo en el sentido de atrofia del mismo parece más frecuente de lo que previamente se pensaba (Takeda *et al.* 2009) e incluso puede observarse en las necropsias de nuestros pacientes. Todo ello podría hacernos pensar que la reducción de la neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado podría ser una alteración primaria y característica de la enfermedad.

Desde luego esta reducción es un elemento diferenciador en los estadios terminales de la enfermedad, pero hasta qué punto es causa o consecuencia de los diferentes sucesos que ocurren en la ELA no puede deducirse de nuestro estudio. Necesitaríamos estudios longitudinales ya sea *in vivo* (con pruebas de neuroimagen con espectroscopía u otras

técnicas de neuroimagen) (Cherubini *et al.* 2010), o bien con modelos animales. Esto es más difícil ya que los modelos transgénicos para mutaciones humanas en la *SOD1* no representan bien las alteraciones histológicas de la ELA y no parecen presentar alteraciones de la neurogénesis en el hipocampo (Nagai *et al.* 2007). Sería interesante analizar como se encuentra la neurogenesis en los nuevos modelos animales de ELA, sobre todo en el de la TDP-43, dado que esta proteína además de con el transporte endosómico y nucleocitoplásmico se ha relacionado con la diferenciación neuronal (Di Carlo *et al.* 2013) y que además en nuestro estudio las alteraciones de la neurogénesis parecen correlacionarse con la presencia de TDP-43 citoplasmática. Pero también sería interesante conocer como se encuentra la neurogénesis en el modelo de la expansión del *C9orf72*, por su alta frecuencia en ELA familiar y esporádica. En estos modelos podría estudiarse no sólo la presencia o ausencia de estas alteraciones en ambos nichos sino si estas se modifican en los diferentes estadios de la enfermedad.

Al tratarse de un estudio de necropsias no tenemos datos de la supervivencia de dichas células (que se considera la fase que más cambia ante los estímulos externos) de su migración, integración y posterior funcionalidad o no. Es decir, en el caso del SVZ si bien sabemos que desde las células pluripotenciales hasta los neuroblastos, pasando por las NPCs hay un aumento de todas las fases, podría ocurrir que estas células recién formadas sufriesen muerte celular precoz o no migrasen o no se integrasen. Por tanto, nuestro estudio sólo nos permite afirmar que las células de la neurogénesis se encuentran aumentadas en la SVZ de los pacientes de ELA pero no podemos afirmar la efectividad o no de la neurogénesis y si esta llega a cumplir realmente su función restauradora.

Por otro lado el hecho de que ambos nichos respondan de forma opuesta ante la misma enfermedad hace pensar que los reguladores de ambos nichos son diferentes o que algún regulador que se modifica en la ELA puede activar cascadas opuestas en sendos nichos neurogénicos. Hasta el momento, los diferentes reguladores que se han descrito para la neurogénesis (ejercicio, edad, estrés, envejecimiento) (Lucassen *et al.* 2015, Klaissle *et al.* 2012), la modifican en el mismo sentido en ambos nichos. Aunque sí que en el caso de la neurogénesis embrionaria y la adulta se ha descrito que el mismo factor regulador puede actuar de forma inversa (Urban y Guillemot 2014). De una manera similar las condiciones

patológicas como la ELA podrían modificar la respuesta a los factores reguladores de forma diferente en los diferentes nichos.

Otra posibilidad que justificaría esta diferente respuesta es que el factor que aumenta la neurogénesis en la SVZ no consiga llegar a la zona subgranular del giro dentado. Esto podría ocurrir si dicho factor o factores se difundieran al líquido cefalorraquídeo (LCR). Previamente en la literatura se ha considerado al LCR como un factor de potencial propagación de la enfermedad y varios grupos han estudiado un potencial efecto citotóxico del LCR sobre las neuronas motoras (Matias-Guiu *et al.* 2010). La presencia de células madre de estirpe glial que emiten prolongaciones hacia el ventrículo en los pacientes con demencia frontotemporal apoyaría esta posibilidad. Un estudio reciente encuentra que la exposición de células madre mesenquimales de cordón umbilical a LCR humano consigue que las mismas se diferencien a neuronas (Farivar *et al.* 2015), esto apoya la posibilidad de que el LCR transporte un factor o factores que sean capaces de estimular la neurogénesis.

IX. c. La estructura de los nichos neurogénicos se modifica en la ELA

El nicho neurogénico no es solo una estructura de soporte ni el lugar donde se encuentran las células precursoras. Los nichos neurogénicos son fundamentales para que la propia neurogénesis exista. De forma que cuando las células pluripotenciales se trasladan desde el nicho a otras zonas pierden su capacidad de diferenciarse en neuronas y cuando se transplantan células de la SVZ al GD dan lugar a células granulares. Es decir los nichos neurogénicos proporcionan el ambiente necesario para la neurogénesis y lo hacen de forma diferente en cada uno de ellos (Garzon-Muvdi y Quinones-Hinojosa 2009).

Nuestro estudio demuestra una modificación no sólo de las células pluripotenciales, neurales potenciales y neuroblastos, sino que la estructura de ambos nichos se encuentra modificada. Es el caso de la SVZ la zona hipocelular (GAP) y la capa *ribbon* que se encuentran aumentadas en su tamaño (prácticamente duplicadas).

Con respecto a la capa GAP, a pesar de que esta es una capa en la que existen pocos cuerpos celulares y está compuesta fundamentalmente por prolongaciones de astrocitos, su incremento parece correlacionarse con los incrementos de la proliferación de la neurogénesis (Marti-Fabregas *et al.* 2010). De hecho, en el caso del ictus, la presencia de este incremento de la capa se correlaciona con la capacidad de migración de los neuroblastos. Aunque en nuestro estudio no se puede medir de forma directa la migración, la presencia de este aumento del tamaño podría sugerir que existe también un aumento de la migración de las células.

La capa *ribbon* es la capa compuesta por los cuerpos astrocitarios, entre ellos se encuentran astrocitos con diferentes funciones algunos de los cuales darán lugar a los neuroblastos. El aumento del tamaño de ambas capas se correlaciona con un aumento del

número de astrocitos marcados con GFAP. Es decir este aumento se debe fundamentalmente a un incremento del número de astrocitos. Este cambio en el nicho podría ser el responsable directo de los cambios encontrados en la proliferación celular, en la fase de NPCs y en la fase de neuroblastos, puesto que los astrocitos en la SVZ tienen funciones de células madre (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009) o podría ser secundario al mismo. En nuestro estudio encontramos que la GFAP co-localiza con las células KI67 y PCNA positivas, es decir con las células neurales progenitoras proliferativas, y por tanto apoya el hecho de que dichas células tienen funciones de células madre.

En el caso de la zona subgranular del giro dentado el tamaño de la capa subgranular no muestra alteraciones. Pero, al igual que en el caso de la SVZ, en el GD existe un aumento significativo del número de astrocitos. Resulta difícil de explicar que la misma alteración histológica, astrocitosis, aparezca en un nicho en el que existe un marcado incremento de la neurogénesis (SVZ) y en otro en el que la neurogénesis prácticamente ha desaparecido (SGZ). El papel de los astrocitos en la neurogénesis del adulto parece ser fundamental, y de hecho son astrocitos los que dan lugar a las NPCs pero por otro lado no debe ser un papel único, de forma que diferentes tipos de astrocitos pueden tener diferentes funciones y diferentes consecuencias sobre la neurogénesis (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009, Peron y Berninger 2015). De hecho, a diferencia de en el caso de las SVZ las células GFAP positivas en la SGZ del giro dentado no co-localizan en su mayor parte con las células Ki-67 positivas, PCNA positivas ni fosfohistona-3 positivas. Lo que hace pensar que, probablemente, no cumplen funciones de verdaderas células neurales progenitoras sino que dan lugar a glía.

El segundo cambio que encontramos en la SGZ del giro dentado afecta a la microglía. Encontramos una reducción de la misma pero con un cambio de la morfología a ameboide, que indica que esta microglía se encuentra activada. Al igual que en el caso de los astrocitos, se ha implicado a la microglía como otra de las poblaciones que da lugar a la neurogénesis, sobre todo en el caso de la SVZ (Ribeiro Xavier *et al.* 2015), por lo que esta reducción de la microglía podría correlacionarse con una reducción de la neurogénesis.

Por otro lado, la alteración de estas células supuestamente estructurales se ha considerado como una de las principales alteraciones no neuronales de la ELA que ocurren además de forma precoz y que parecen correlacionarse directamente con la muerte neuronal en esta enfermedad (Pirooznia *et al.* 2014, Johansson *et al.* 2007). Las alteraciones de la microglía son igualmente precoces (para algunos anteriores a la astrocitosis) y su papel protector o dañino para la neurona motora no está claramente establecido. Es más, podría ocurrir que dependiendo del momento de la enfermedad el papel de la microglía sea diferente (Zhang *et al.* 2011, Frakes *et al.* 2014). Existe la posibilidad de que estas alteraciones de la glía descritas en la ELA sean las responsables de los cambios observados en la neurogénesis, pero nuestro estudio no permite llegar a esta conclusión. Para poder establecer esta relación necesitaríamos estudios que nos permitan ver qué es anterior el cambio de la glía o la modificación de la neurogenesis y de nuevo si los cambios de la glía en el nicho aparecen al mismo tiempo que en el resto del sistema nervioso en la ELA.

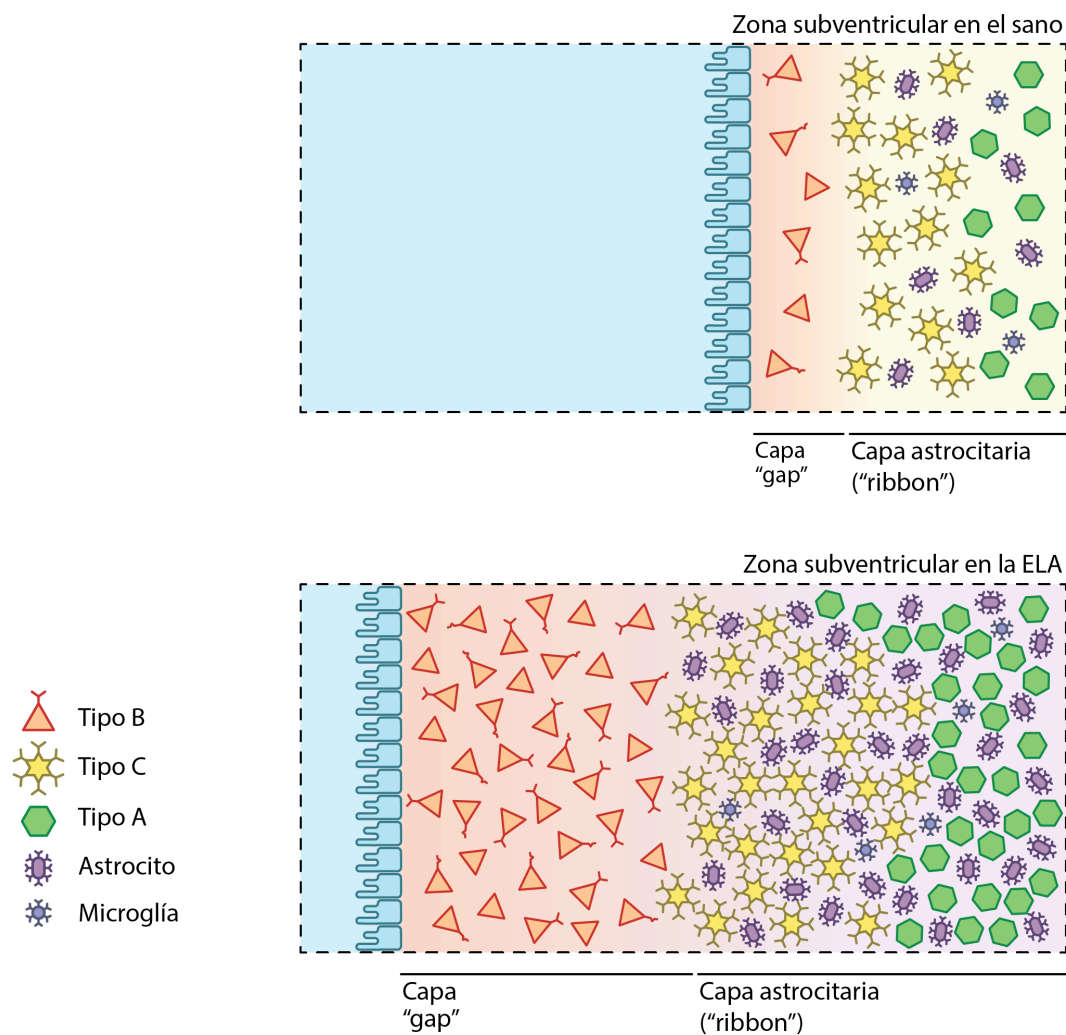


Imagen 21: Modificaciones de la neurogénesis en la SVZ en los pacientes con ELA. En el dibujo se esquematiza el aspecto de la zona subventricular en el control y en los pacientes con ELA. En los pacientes con ELA encontramos un aumento de la capa GAP y la capa ribbon, una marcada astrocitosis y un incremento de todas las células de la neurogénesis desde la célula tipo B hasta los neuroblastos o células tipo A. El dibujo refleja las proporciones de cambio observadas en nuestro estudio.

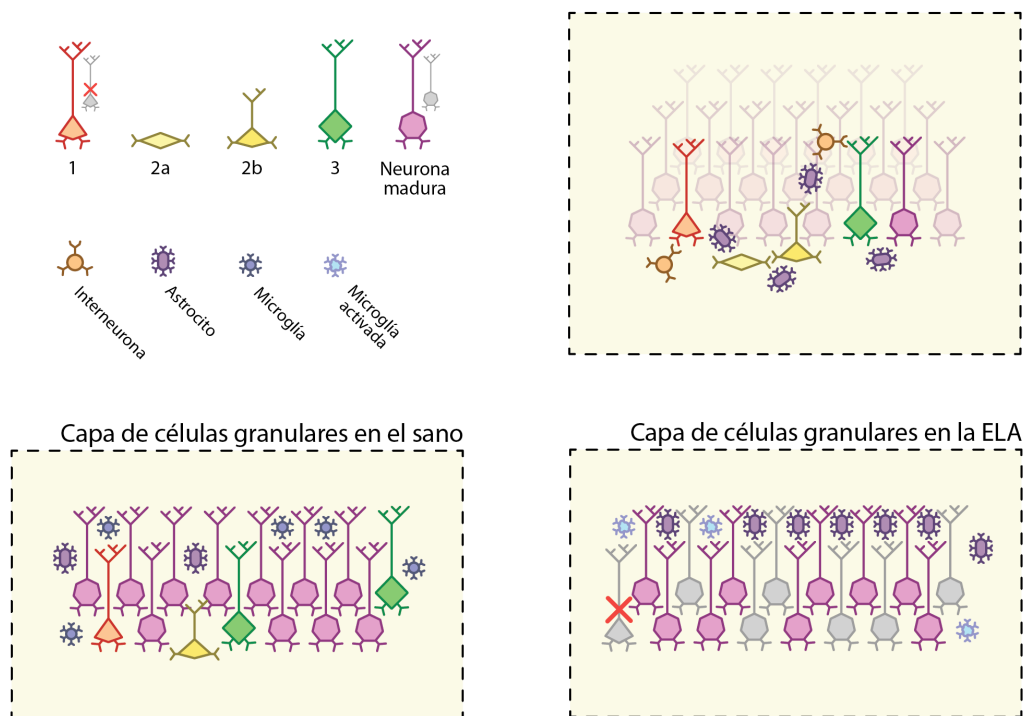


Imagen 22: Esquema de los cambios encontrados en la neurogenesis en la zona subgranular. El dibujo esquematiza los resultados encontrados en las necropsias de los pacientes con ELA con respecto a los controles. El tamaño de la capa granular se encuentra preservado pero existe un aumento de la gliosis y una reducción de la cantidad de microglía aunque ésta se encuentra reducida. Todas las fases celulares de la neurogénesis se encuentran marcadamente reducidas.

IX. d. La modificación de la neurogénesis en los pacientes con ELA afecta a todas las líneas celulares, desde las células pluripotenciales hasta los neuroblastos

En algunas enfermedades como en la Enfermedad de Alzheimer se ha descrito en algunos estadios un aumento de la proliferación celular en la SVZ que afecta exclusivamente a las células pluripotenciales (tipo A) pero no progresa a las otras células, células neurales pluripotenciales (NPCs, tipo B) y neuroblastos (Winner y Winkler 2015, Curtis *et al.* 2007b).

En nuestro estudio la modificación de la neurogénesis en la ELA afecta a todas las fases celulares de la misma, desde las células pluripotenciales hasta los neuroblastos. En el caso de las SVZ todas las fases se encuentra incrementadas. Es decir, parece que la enfermedad es capaz de aumentar la proliferación de las células pluripotenciales, pero además estas pasan a fase de NPCs y a neuroblastos. Aunque nuestro estudio es un estudio de necropsia que no nos permite asegurar con certeza la diferenciación de una a otras células, el hecho de que todas las fases se encuentren incrementadas apoya esta posibilidad (imagen 21). Por otro lado, este aumento de todas las fases celulares es indicador de que el aumento de las células progenitoras tiene una diferenciación neuronal verdadera sin que derive a un aumento de otro tipo de células (astrocitos, oligodendroglia, etc.)

Cuando se analiza el hipocampo ocurre algo similar aunque en el sentido contrario, es decir, todas las células se encuentran muy reducidas desde las células proliferativas pluripotenciales hasta los neuroblastos (imagen 22). De nuevo, este resultado hace pensar en que la disminución de la neurogénesis ocurre desde el inicio de la misma, con una reducción de las células precursoras de forma que la cascada de la neurogénesis se detiene muy precozmente. Llama la atención que con algunos marcadores como la doblecortina en algunos casos no encontrábamos células marcadas en el hipocampo, lo que indicaría que existe no sólo una pérdida de neuroblastos marcadas sino también de neuronas (puesto que las neuronas maduras pueden marcar con estos marcadores). Sin embargo, no se puede

excluir que este hecho se deba a problemas relacionados con el tiempo transcurrido hasta el procesamiento de las muestras.

IX.e. La presencia de demencia frontotemporal hace que la respuesta del nicho neurogénico sea mayor

Como hemos reseñado, el número de células madre se altera en los dos nichos neurogénicos clásicos en los pacientes con ELA. En el caso de la SVZ, nicho al que se le ha atribuido una posible función reparadora ante las condiciones patológicas, se encuentra un marcado aumento de todos los tipos de células del nicho desde las células madre pluripotenciales a los neuroblastos. En el caso del GD, cuya función en condiciones fisiológicas se asocia con la memoria y se conoce peor su respuesta ante las situaciones patológicas pero parece estar disminuido en las enfermedades neurodegenerativas, se encuentra una reducción marcada de la neurogénesis. Esta reducción se ha encontrado en algunas otras patologías neurodegenerativas, pero generalmente asociada también a reducción de la neurogénesis en la SVZ (Winner y Winkler 2015), por lo que se hipotetiza que esta neurogénesis no sea consecuencia de estas enfermedades sino constituya un hecho más de la cadena causal de las mismas (Winner y Winkler 2015). En la SVZ encontramos no sólo que el aumento de la neurogénesis sea mayor sino que aparecen astrocitos con características de células madre que emiten una prolongación hacia el ventrículo lateral. Estos astrocitos se habían descrito previamente en roedores, pero no en patología humana (Quinones-Hinojosa *et al.* 2007).

En los últimos años se ha pasado de considerar a la ELA como una enfermedad exclusiva de la neurona motora a una enfermedad en la que existe una afectación de múltiples áreas cerebrales y de múltiples tipos celulares (Mancuso y Navarro 2015). Desde el punto de vista de la afectación de las diferentes áreas neuronales la primera asociación se describió en los pacientes de la isla de Guam que asociaban precisamente demencia de características frontotemporal y parkinsonismo (Kaji *et al.* 2012). Dado que esta enfermedad parece ser debida a la ingesta de una neurotoxina (el cicad) parece más fácil entender la diseminación a diferentes áreas del sistema nervioso central. En cualquier caso, resulta interesante considerar que precisamente en esta forma de esclerosis lateral amiotrófica parece existir una alteración del olfato en el humano (Ahlskog *et al.* 1998) y que en los ratones que se exponen a la toxina cicad sufren cambios en el olfato que

aparecen de forma bastante precoz (Kisby *et al.* 2011), aunque no disponemos de datos sobre la neurogénesis ni en el humano ni en este mismo modelo animal expuesto a la toxina. Sería muy interesante disponer de datos en este sentido.

El segundo momento clave para considerar la ELA como una enfermedad relacionada con la DFT fue el descubrimiento de la presencia de inclusiones de TDP-43 citoplasmáticas en esta enfermedad (Mackenzie *et al.* 2007) en prácticamente todas sus formas (con exclusión de las formas familiares ligadas a la *SOD1* y a la *FUS*). Estas inclusiones habían sido descritas en la demencia frontotemporal con anterioridad. Esto junto con el descubrimiento de que algunos genes que provocan DFT también pueden provocar ELA (*TARDBP*, *FUS* y *C9Orf72*) llevó a que algunos autores afirmaran que la ELA y la DFT constituyen dos manifestaciones del espectro de una misma enfermedad, en la que la forma más grave presentaría ambos síndromes (Ferrari *et al.* 2011).

En nuestra muestra contábamos con dos pacientes con demencia frontotemporal diagnosticada a la que posteriormente asociaron una enfermedad de neurona motora rápidamente progresiva. Llama la atención que con respecto a la neurogénesis estos pacientes tenían el mismo tipo de alteraciones que los pacientes sin demencia pero más marcada. En el caso de la SVZ un aumento mayor de la capa hipocelular (GAP) y de la capa *ribbon*, con astrocitosis y aumento del número de células neurales progenitoras proliferativas, células neurales pluripotenciales y de los neuroblastos. En el caso de la SGZ del giro dentado la reducción es tan importante que en muchas ocasiones no se consiguió encontrar ninguna de las células (células pluripotenciales, células neurales pluripotenciales o neuroblastos) en los 8 campos analizados. Dado el pequeño tamaño de la muestra no se puede realizar un estudio estadístico fiable, aunque tanto en uno como en otro sentido las alteraciones son llamativas. Llama la atención que en nuestros pacientes el porcentaje de TDP-43 fosforilada se correlaciona con las alteraciones de la neurogénesis. Estos hallazgos parecen apoyar que la ELA, la FTD y la FTD-ELA son diversas manifestaciones clínicas de un mismo continuo. De hecho, las manifestaciones cognitivas en la ELA sin llegar al grado de demencia están presentes de forma relativamente frecuente (Beeldman *et al.* 2015). Queda por establecer por qué algunos pacientes no desarrollan el cuadro completo y presentan apenas alguna de las dos manifestaciones. Igualmente podría ocurrir que algunos

pacientes con clínica de ELA o con clínica de DFT constituyan una patología diferente (Turner y Swash 2015). Por ejemplo, al menos en el modelo experimental, la ELA ligada a mutaciones en la *SOD* no se asocia a deterioro cognitivo significativo, por lo que esta forma particular de ELA podría no formar parte de este espectro.

Otra cuestión interesante sería establecer si precisamente es la neurogénesis la que da lugar a la relación entre ambas enfermedades, la reducción de la neurogénesis en el GD (que en el caso de los pacientes con DFT es prácticamente ausencia) más concretamente se ha relacionado con manifestaciones psiquiátricas y déficit de memoria, por lo que resulta atractivo pensar que es esta reducción la que causa el cuadro de demencia frontotemporal. Nuestro estudio sin embargo no es capaz de establecer esta relación, es más, llama la atención la intensa reducción de la neurogénesis en el GD en los pacientes sin DFT o incluso sin síntomas neuropsiquiátricos. Sería interesante disponer de estudios de la neurogénesis en casos de DFT sin ELA asociada, porque nos permitiría saber si las alteraciones son las mismas que en el caso de la ELA.

IX. f. La modificación de la neurogénesis no varía de forma significativa cuando se consideran las otras características de la muestra

Se ha descrito previamente que la edad es uno de los factores que modula la neurogénesis, de forma que a mayor edad menor neurogénesis (Bondolfi *et al.* 2004, Jin *et al.* 2003), por lo que se realizó un estudio de regresión para determinar si existía una correlación entre la edad y la neurogénesis. No se encontró en nuestros pacientes una correlación entre la edad y la neurogénesis en ninguna de las fases estudiadas: células pluripotenciales proliferativas (C, tipo 1), células neurales pluripotenciales (B, tipo 2a) o neuroblastos (A, tipo 3). Y tampoco en ninguno de los nichos estudiados (SVZ y GD). Hay que reseñar que nuestro estudio tiene un rango de variación de edad en el momento de la muerte relativamente pequeño. Algunos trabajos previos han encontrado que la reducción de la neurogénesis por la edad se revierte por algunos factores como el estar sometido a un entorno rico en estímulos (Kempermann *et al.* 2002), por lo que podría pensarse que en la ELA exista algún factor que revierta dicha acción de la edad sobre la neurogénesis. En contra de esta posibilidad está el hallazgo de que tampoco encontramos una reducción significativa de la misma en los controles, aunque nuestra muestra de controles es relativamente pequeña.

Dado que se había descrito un potencial papel del tratamiento con riluzol aumentando la neurogénesis (Bellingham 2011) y dado que tres de nuestro pacientes no recibían tratamiento con riluzol, se realizó un análisis para las diferentes fases celulares de la neurogénesis entre los pacientes que recibían o no este tratamiento. No existía diferencia significativa entre ambos grupos para ninguna de las fases celulares, ni para los marcadores de cambio de estructura del nicho en la SVZ ni en la SGZ el giro dentado. Debe considerarse no obstante, que los pacientes de nuestra muestra que no recibían riluzol eran los pacientes con formas más rápidamente progresivas y que dos de ellos de un total de tres eran los pacientes con DFT asociada. Este hecho puede sesgar de forma significativa el

resultado encontrado. Para establecer de forma más segura el papel del riluzol sobre la neurogénesis sería necesario realizar estudios en pacientes al inicio de la enfermedad antes y después del inicio del tratamiento. Estos estudios deberían ser estudios de seguimiento in vivo. El principal problema es que los estudios in vivo no están actualmente validados para la neurogénesis.

Puesto que las alteraciones neuropsiquiátricas ,depresión y ansiedad, se han considerado como posiblemente asociadas a la neurogénesis (Schoenfeld y Cameron 2014) se realizó un análisis diferencial entre los pacientes que presentaban este tipo de manifestaciones o no. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las fases celulares de la neurogénesis (células neurales progenitoras proliferativas, células neurales pluripotenciales y neuroblastos) ni en la SVZ ni en la SGZ del GD. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la estructura del nicho, ni en el tamaño de las capas *GAP* y *ribbon* en la SVZ ni en la presencia de gliosis o en las alteraciones de la microglía. Sin embargo, en este estudio los datos se recogieron de una manera retrospectiva, y si bien es cierto que la presencia de depresión se recoge como uno de los ítems de la vía clínica de atención en la ELA(Rodriguez de Rivera *et al.* 2007) , los otros síntomas neuropsiquiátricos pueden haber pasado desapercibidos.

Por último, considerando que las formas de inicio bulbar presentan una evolución más rápida (DeLoach *et al.* 2015) y una menor supervivencia, si la alteración de la neurogénesis fuera mayor cuánto más agresiva sea la enfermedad, los pacientes con ELA de forma bulbar se comportarían de forma similar a los pacientes con DFT, es decir las alteraciones de la neurogénesis serían en ellos más extremas. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre las formas de inicio bulbar ni espinal. Estas diferencias no existían en ninguno de los nichos estudiados (SVZ y SGZ del GD), en ninguna de las fases celulares (células neurales progenitoras proliferativas, NPCs y neuroblastos), y tampoco en lo que se refiere a la estructura de los nichos (tamaño de las capas *GAP* y *ribbon*), ni a su composición celular astrocitos y microglía. El hecho de que las formas de inicio bulbar no modifiquen la forma en la que la neurogénesis se encuentra alterada en la ELA podría hacer pensar que en el caso de la ELA asociada con DFT no nos encontramos solo con una forma más grave de la enfermedad sino que las mayores alteraciones de la neurogénesis

tengan que ver con algún otro factor asociado. Sin embargo hay que considerar que la mayor gravedad de las formas de inicio bulbar no parece ser debida a una propagación más rápida de la enfermedad sino a que afecta desde el inicio a zonas que son vitales para el paciente.

Se analizó igualmente las variaciones de la neurogénesis en la muestra conforme al sexo, pero igualmente no se encontraron modificaciones para ninguno de los nichos analizados ni ningunas de las fases celulares.

IX. g. ¿Es el patrón de modificación de la neurogénesis en la ELA específico de la misma?

Existen pocos estudios en pacientes con enfermedades neurodegenerativas que analicen ambos nichos neurogénicos en los mismos pacientes. La mayor parte de los estudios en humano se centran en el nicho supuestamente implicado como es el GD en las patologías que afectan a la memoria. Por ello, la mayoría de los resultados que tenemos en humanos analizan sea la SVZ, sea el GD. El hecho de que ambos nichos neurogénicos no se analicen en el mismo estudio, puede cambiar los resultados, puesto que varía los métodos utilizados, así como las propias características de la muestra.

En cualquier caso, hasta este momento no se ha publicado un patrón similar de afectación de la neurogénesis en los nichos en ninguna de las enfermedades neurodegenerativas (tabla 1). El más parecido es el de la Enfermedad de Huntington en el que se ha encontrado un aumento en la SVZ (Curtis *et al.* 2007a), pero no existen alteraciones en la SGZ del giro dentado (Low *et al.* 2011). Sin embargo, en la ELA nuestro trabajo demuestra un aumento de la neurogénesis en la SVZ con marcada reducción de la neurogénesis en el hipocampo. El otro caso en el que se encuentran divergencias es el de la enfermedad de Alzheimer (Bossers *et al.* 2010, Curtis *et al.* 2007a), aunque en este caso lo que se describe es un aumento de la neurogénesis en ambos nichos en las fases iniciales con una reducción de la misma en estadios finales, de nuevo en ambos nichos neurogénicos. De hecho, los autores evocan que el incremento de la proliferación de alguna manera consigue “agotar” la neurogénesis y es el mismo aumento el que lleva a la reducción en los estadios terminales.

A pesar de ello, no se puede afirmar con nuestro estudio si este patrón de alteración de la neurogénesis es específico de la enfermedad. Dado que no formaba parte de nuestros objetivos comparar la neurogénesis en la ELA con otras enfermedades neurodegenerativas no se incluyó en el trabajo la comparación con otras enfermedades neurodegenerativas. Un estudio en este sentido, que incluyera diversas enfermedades neurodegenerativas en las que se evaluaran ambos nichos neurogénicos podría permitir establecer si el patrón es o no

específico de la enfermedad incluso comparar si la afectación de la neurogénesis es cuantitativamente diferente en las diferentes enfermedades neurodegenerativas.

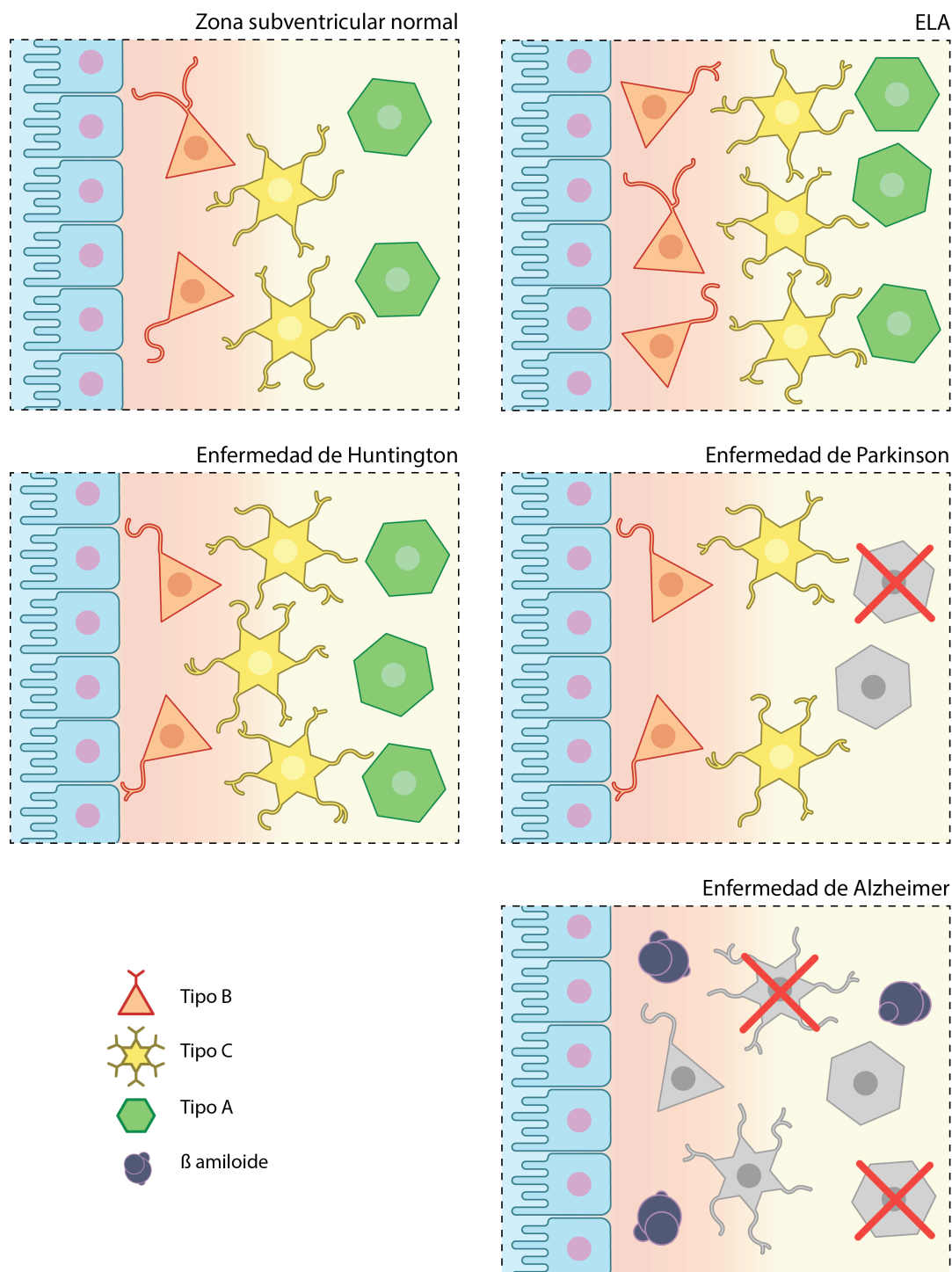


Imagen 23: Comparativa de la SVZ en las enfermedades neurodegenerativas en humanos. El dibujo esquematiza los cambios encontrados en la literatura en la SVZ en humanos en las enfermedades neurodegenerativas y los encontrados en nuestros pacientes con ELA. Sólo en el caso de la enfermedad de Huntington. En el caso de la ELA nosotros encontramos un aumento de todas las fases celulares de la neurogenesis. En la enfermedad de Parkinson y en los estadios terminales de la enfermedad de Alzheimer se encuentra una reducción de la neurogénesis. Las células marcadas en gris son células en proceso de muerte.

IX. h. El porcentaje de TDP-43 fosforilada se correlaciona con las alteraciones de la neurogénesis

En la ELA se ha descrito una alteración de la TDP-43 consistente en la presencia de inclusiones de esta proteína que se localizan en el citoplasma (Mackenzie *et al.* 2007) que esta presente en todos los casos de ELA salvo en aquellos ligados a la *FUS* y a la *SOD1*. Aunque algunos autores han descrito inclusiones TDP-43 en el citoplasma de pacientes con mutaciones en la *SOD1* (Okamoto *et al.* 2011) y en los cultivos de células procedentes de pacientes con mutaciones en la *SOD1* (Sabatelli *et al.* 2015). El papel de la TDP-43 en la etiopatogenia de la ELA está discutido (Baralle *et al.* 2013). Pero se ha relacionado con la propagación de la enfermedad a través de un mecanismo pseudopriónico (Grad *et al.* 2015), con el transporte endoplásmico (Soo *et al.* 2015) y con el metabolismo del ARN (Peters *et al.* 2015). Algunos autores han llegado a estadificar el grado de presencia de la TDP-43 en los casos de ELA correlacionando su propagación con la propagación de la enfermedad (Brettschneider *et al.* 2013).

En nuestro trabajo encontramos un aumento significativo del porcentaje de TDP-43 citoplasmática (pero no de la TDP-43 total) en todos los pacientes con ELA. Este aumento es mayor en los pacientes que asocian demencia frontotemporal, lo que concuerda con otros estudios previos (Brettschneider *et al.* 2013). Curiosamente, en nuestra muestra, el estudio anatomopatológico convencional en que la presencia o ausencia de inclusiones TDP-43 se hace de una forma cualitativa, tiende a subestimar la presencia de estas inclusiones en el citoplasma.

Cuando realizamos un estudio para determinar si existía una correlación entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmático y la neurogénesis, encontramos que existe una correlación significativa entre ambas que además presenta un signo inverso dependiendo del nicho neurogénico que estemos analizando. En el caso de la SVZ la correlación es directa y lineal, es decir a más porcentaje de TDP-43 fosforilada más neurogénesis. Esta correlación se mantiene para todas las fases celulares: células pluripotenciales proliferativas (C), células neurales pluripotenciales (B) y neuroblastos (A). En lo que

respecta a la estructura del nicho de nuevo existe una relación directa y lineal entre el porcentaje de TDP-43 y el tamaño de la capa hipocelular (*GAP*), pero no con el tamaño de la capa astrocitaria (*ribbon*). Existe también una correlación directa y lineal entre el porcentaje de TDP-43 citoplasmática y la gliosis del nicho. En el caso del hipocampo, encontramos una relación inversa y exponencial. Es decir a mayor TDP-43 menor neurogénesis. Esta reducción es significativa para todas las fases celulares de la neurogénesis (células pluripotenciales proliferativas, células neurales pluripotenciales y neuroblastos).

En resumen, encontramos que en ambos nichos la relación entre el porcentaje de TDP-43 y los astrocitos del nicho es directa y lineal: a más TDP-43, más astrocitos. Sin embargo, el resto de la neurogénesis se correlaciona de forma opuesta en los dos nichos. Pero, debemos considerar que en el caso de la SVZ en nuestro estudio las células que marcan para GFAP co-localizan con las que marcan para otros anticuerpos de células neurales progenitoras proliferativas (Ki-67, PCNA) y por tanto parecen corresponder a verdaderas células madre progenitoras neurales (tipo B), pero esto no ocurre en el caso del GD, donde las células GFAP positivas no co-localizan con otros marcadores de proliferación y por tanto, no parecen corresponder a verdaderas células madre sino más bien a gliosis. En el SVZ encontramos un aumento de la neurogénesis cuanto mayor es el porcentaje de TDP-43 citoplasmática. En el hipocampo la relación es la contraria cuanto mayor el porcentaje de TDP-43 citoplasmática mayor la reducción de la neurogénesis.

Se ha descrito un papel de la TDP-43 en la diferenciación neuronal (Di Carlo *et al.* 2013), pero este papel no explicaría el aumento en las fases precoces de la neurogénesis (células tipo C) en la SVZ ni la reducción en la SGZ del giro dentado. Igualmente se ha correlacionado la presencia de TDP-43 en la ELA con alteraciones del olfato, que se consideran un síntoma de alteración de la neurogénesis (Takeda *et al.* 2014), de nuevo resulta difícil explicar la relación directa con el incremento de la neurogénesis en la SVZ. Sin embargo, si consideramos que el porcentaje de TDP-43 fosforilada se ha correlacionado con el grado en que la enfermedad se ha propagado por el sistema nervioso central podríamos pensar que lo que encontramos es una correlación de la neurogénesis con el grado de expansión de la enfermedad. En cualquier caso, dado que no formaba parte

de nuestros objetivos iniciales el diseño de nuestro trabajo no permite esclarecer la causa de la relación de estas variables ni si es reflejo de una relación etiopatogénica.

Cuando analizamos si existían diferencias significativas del porcentaje de TDP-43 citoplasmática según las otras variables de la muestra. Sólo se encontraron diferencias entre aquellos pacientes que recibían riluzol como tratamiento, los cuales presentaban una reducción del porcentaje de TDP-43 con respecto a los pacientes no tratados con este fármaco. Debe reseñarse que dos de los tres pacientes que no recibían tratamiento con riluzol asociaban DFT, que como hemos visto es una de los factores que aumentaba el porcentaje de TDP-43 en nuestro pacientes. No obstante, es cierto que cuando se analizó la diferencia entre los pacientes con o sin riluzol para todas las otras variables (neurogenesis en SVZ, neurogenesis en hipocampo y modificación del nicho) no se encontraron diferencias significativas. Un reciente estudio neuropatológico encuentra resultados contrarios a los que observamos en nuestra muestra, es decir, los pacientes que reciben tratamiento con riluzol tienen un mayor porcentaje de TDP-43 (Coan y Mitchell 2015).

IX. i. En algunos de los pacientes se observa depósito de amiloide en hipocampo

En dos de nuestros pacientes, la paciente 1 y el paciente 7 se encontraba en el estudio anatomopatológico depósito significativo de amiloide. De ellos, la paciente presentaba alteración cognitiva, pero no tipo Alzheimer sino tipo demencia frontotemporal, con respecto al paciente 7 no consta en la historia cuadro cognitivo. Se realizó una encuesta telefónica a la familia en la que tampoco se detectó historia de alteraciones cognitivas.

La presencia de depósitos de amiloide en la ELA se ha descrito desde hace algún tiempo (Hamilton y Bowser 2004) , llevando a algunos autores a intentar establecer una relación patogénica entre la enfermedad de Alzheimer y la ELA (Wang *et al.* 2014b). La presencia en las series de necropsia de amiloide oscila entre el 20 al 50 % (Coan y Mitchell 2015, Hamilton y Bowser 2004) y no se correlaciona claramente con la presencia de alteraciones cognitivas. En nuestra serie de pacientes hemos encontrado la presencia de amiloide en un 22 % de los casos, no obstante hay que destacar que este porcentaje es el encontrado con un análisis visual de la amiloide, sin realizar técnicas de inmunohistoquímica a todos las necropsias ni realizar una cuantificación de las mismas; dado que en el caso de la TDP-43 citoplasmática hemos encontrado una diferencia significativa entre el análisis visual y el cuantitativo, sería recomendable diseñar un estudio en el que se realizase a todas las necropsias de los pacientes un estudio inmunohistoquímico de la amiloide para valorar si la frecuencia encontrada es la misma o mayor. Esto nos permitiría además identificar mejor las características del amiloide depositado.

Se ha relacionado al amiloide y a la proteína precursora de amiloide (APP) con una reducción de la neurogénesis fundamentalmente en el hipocampo, aunque algunos autores consideran que la amiloide podría provocar inicialmente un aumento de la neurogénesis que posteriormente llega a agotar la misma (Wang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2014a). En nuestro trabajo encontramos una marcada reducción de la neurogénesis en la SGZ del giro

dentado pero afecta a todos los pacientes, no sólo a los que presentan depósito de amiloide en las necropsias. Para establecer si existe o no relación entre la presencia de amiloide y la reducción de la neurogénesis en el hipocampo observada en los pacientes con ELA sería necesario hacer un estudio diseñado a tal efecto, en que la presencia o ausencia de amiloide se determinara con inmunohistoquímica y se cuantificase, puesto que al igual que en el caso de la TDP-43 podría ocurrir que las técnicas convencionales infraestimen el depósito de amiloide en la enfermedad.

IX. j. La muestra de pacientes que ceden tejidos para investigación tiene unas características especiales

Cuando se analiza la muestra de pacientes con ELA que ceden tejidos para investigación observamos que tiene unas características especiales. En primer lugar es una muestra de pacientes con formas de especial baja supervivencia. De hecho, la media de supervivencia desde el inicio de los síntomas es de 19 meses. La media de supervivencia de la serie histórica de pacientes con ELA seguidos en la Unidad de ELA de nuestro centro es de 89 meses. Igualmente la serie comprende un 50% de formas bulbares, frente al 30% de nuestra serie histórica y un 22% de pacientes con DFT frente a un 3% en nuestra serie histórica. Si bien es cierto, que la frecuencia de DFT que se comunica en los estudios de otros grupos oscilan entre un 5 y un 20% (Beeldman *et al.* 2015).

Probablemente esto sea debido a un sesgo de selección, los pacientes con formas más agresivas de la enfermedad o sus familiares tienen una mayor tendencia a participar en ensayos y protocolos de investigación, e igualmente a donar su cerebro tras el fallecimiento para la realización de diferentes estudios. Igualmente ante formas graves, rápidamente progresivas o con características especiales (como la presencia de demencia frontotemporal) los médicos solicitan más los estudios de necropsia. El hecho de que nos encontremos frente a formas especialmente graves de la enfermedad, podría influenciar los resultados de nuestro estudio, puesto que se trata de las formas extremas de la enfermedad. Esta especial agresividad podría hacer que las alteraciones observadas en el nicho neurogénico tanto a nivel celular como de la misma estructura fuesen mayores que en pacientes de supervivencia más alta. En contra de esto tendríamos los resultados encontrados en el paciente 3, que tiene una supervivencia de 64 meses, y presenta las mismas alteraciones que los pacientes de supervivencias más cortas.

IX. k. Un 77% de los pacientes de nuestra serie presentan atrofia en la neuroimagen

Cuando revisamos las pruebas de neuroimagen (TAC y RM) de los pacientes incluidos en el estudio, tan sólo 2 de los pacientes presentaban una neuroimagen normal. En el resto se encontraba atrofia generalmente localizada en la zona frontal y temporal. Esta atrofia estaba presente en pacientes sin alteraciones cognitivas descritas en la historia clínica ni en la encuesta telefónica que se realizó a los familiares.

Existen estudios previos que refieren la presencia de atrofia en los pacientes con ELA en estas misma localizaciones que tiende a agravarse a lo largo de la enfermedad (Kato *et al.* 1993, Takeda *et al.* 2009), incluso un artículo reciente encuentran en los pacientes con ELA-DFT alteraciones en estas zonas e incluso en sustancia blanca y cuerpo calloso (Agosta *et al.* 2015). La valoración de las pruebas de neuroimagen en nuestro trabajo se hizo de una manera cualitativa y no controlada, puesto que la mayor parte de los controles no padecían enfermedades neurológicas y no disponíamos de neuroimagen de ellos. Para poder valorar con más seguridad la presencia de atrofia en la neuroimagen de los pacientes con ELA sería necesario realizar un estudio controlado en el que se cuantificase la atrofia en las diversas zonas y, probablemente, con pruebas de neuroimagen repetidas para valorar si, como se ha descrito previamente, esta atrofia tiende a agravarse a medida que avanza la enfermedad. En nuestro estudio no encontramos que la presencia o ausencia de atrofia se correlacionase con las modificaciones de la neurogénesis.

IX. 1. Los síntomas neuropsiquiátricos son frecuentes en los pacientes con ELA

Cuando se revisaron las historias clínicas de los pacientes se encontró que 5 de los 9 presentaban al menos un síntoma neuropsiquiátrico, entre los que se incluían apatía, depresión, ansiedad y trastornos del sueño. La presencia de estas alteraciones es relativamente alta en nuestra serie, si bien es cierto, que se trata de una serie de pacientes con formas particularmente agresivas de la enfermedad y que se trata de una enfermedad sin tratamiento curativo y muy discapacitante, por lo que la presencia de depresión o ansiedad parecen estar justificadas. En este sentido los porcentajes de ansiedad y depresión que se encuentran en la literatura son muy variables, oscilando entre un 0 y un 44%, aunque cuando se utilizan elementos estructurados para su detección no suelen exceder el 10% de los casos (Kurt *et al.* 2007). Ninguno de nuestros pacientes había sido diagnosticado a través de cuestionarios estructurados, por lo que el número de pacientes podría estar sobreestimado.

Este tipo de alteraciones neuropsiquiátricas, junto con las alteraciones del olfato, que no encontramos referidas en ninguno de nuestros pacientes, se han descrito como síntomas iniciales de la reducción de la neurogénesis en las enfermedades neurodegenerativas (Winner y Winkler 2015). Sin embargo, cuando realizamos el análisis de las diferentes alteraciones en la neurogénesis considerando los pacientes con o sin estos síntomas, no encontramos diferencias significativas ni para la SVZ ni para el hipocampo en ninguna de las fases celulares estudiadas ni en lo que se refería a la estructura del nicho neurogénico.

IX. m. ¿Podría ser la estimulación de la neurogénesis adulta intrínseca una potencial vía terapéutica en la ELA?

En otras enfermedades neurodegenerativas se ha considerado la posibilidad de que la estimulación de la neurogénesis constituya una vía terapéutica (Foltynie 2015, Nagahara y Tuszynski 2011). Dado que la ELA es una enfermedad sin tratamiento curativo, encontrar una posible diana terapéutica es de vital importancia. A favor de esta opción encontramos que los dos nichos neurogénicos clásicos están presentes en los pacientes con ELA, con un importante incremento de la neurogénesis en todas las fases en la SVZ. Puesto que este es el nicho al que se le ha atribuido una función reparadora, basado fundamentalmente en los estudios experimentales de lesión aguda como el ictus (Zhang *et al.* 2014), parecería lógico que este tipo de tratamientos se dirigieran fundamentalmente a la SVZ.

En nuestro estudio encontramos un marcado aumento de la proliferación y de las fases de NPCs y neuroblastos en ELAs que fallecen por estadio terminal de la enfermedad. Esto nos hace pensar que algunas de estas células no sobreviven, o bien no se integran o bien esta integración no es suficiente para frenar la evolución de la enfermedad. Por lo que al diseñar estrategias en este sentido sería necesario tener un conocimiento mayor sobre lo que ocurre en las siguientes fases de la neurogénesis puesto que probablemente sea a esos niveles (supervivencia celular, migración, etc.) o en la combinación de varios niveles donde una actuación sea más efectiva.

Nuestro estudio encuentra, una reducción muy importante de la neurogénesis en el hipocampo que en los pacientes con demencia frontotemporal es tan marcada que en muchas ocasiones no se encuentran células pluripotenciales proliferativas, NPCs y neuroblastos. Otra cuestión que surge es si sería beneficioso mejorar la neurogénesis en este nicho en el que la misma se encuentra tan reducida, y si así fuera en qué momento podría ser efectiva. De nuevo esta pregunta no se puede resolver con nuestro estudio y precisaría de estudios en modelos experimentales, con la dificultad añadida de la falta de un buen modelo experimental en la ELA, o en estudios computacionales de sistemas biológicos.

Por último, otro punto sobre el que hipotéticamente se podría actuar es sobre la propia alteración estructural del nicho. En este sentido ambos nichos presenta un incremento de los astrocitos. Por lo que, al menos hipotéticamente, un tratamiento diseñado para actuar a este nivel podría tener acción beneficiosa en ambos nichos neurogénicos. Sin embargo la función astrocitaria parece ser diferente en ambos nichos, por lo que aún actuando a este nivel el efecto obtenido podría ser diferente.

En cualquier caso, aunque la presencia del incremento de la neurogénesis en la SVZ, nos abre la posibilidad de utilizar la neurogénesis del adulto como diana terapéutica en esta enfermedad, para poder llegar a este objetivo habría que incrementar el conocimiento de la situación de la misma y de los factores que la regulan, utilizando no sólo estudios de necropsia sino estudios in vivo que permitan analizar las modificaciones de la neurogénesis en las diferentes fases de la enfermedad. Así cualquier tratamiento en este sentido debería realizarse de una manera controlada y con estudios previos de seguridad porque el aumento de la neurogénesis se ha relacionado también con la formación de tumores (Quinones-Hinojosa y Chaichana 2007).

IX. n. Limitaciones del estudio

Nuestro trabajo permite analizar el estado de la neurogénesis en la ELA en el humano, pero lo hace a través de un estudio de necropsias, por lo que tenemos una imagen transversal que además corresponde a la fase terminal de la enfermedad (todos nuestros pacientes fallecieron por la enfermedad y en estadio terminal de la misma). Esta imagen transversal no nos permite conocer qué ocurre en otros momentos de la enfermedad, por ejemplo al inicio de la misma. Puesto que se ha descrito en algunas otras enfermedades que la neurogénesis puede variar a lo largo de la progresión de la enfermedad, es el caso de la enfermedad de Alzheimer (Bossers *et al.* 2010), los resultados que se ha encontrado en los estadios terminales de la ELA (aumento de la neurogénesis en SVZ y reducción en hipocampo) podrían no aparecer en otras fases de la enfermedad. Para resolver este problema sería necesario diseñar estudios *in vivo* o, en caso de disponer de un buen modelo experimental, estudiar las modificaciones en él. Sin embargo, en los estudios *in vivo* perdemos la seguridad de si lo que medimos corresponde realmente a la neurogénesis y en el caso de los estudios en modelos animales no sabemos hasta que punto representan de forma fidedigna la enfermedad en el humano.

Por otro lado los marcadores de inmunohistoquímica que utilizamos para cuantificar las células en sus diferentes fases pueden ser positivos en la transición de dos estadios diferentes. Así por ejemplo el GFAP delta puede ser positivo ya en algunas células neurales progemitoras tipo B aunque es más característico de las tipo C, igualmente las NPCs pueden empezar a expresar DCX y PSA-NCAM justo antes de convertirse en neuroblastos. Una cuestión especialmente difícil es el uso de la GFAP en el contexto de la neurogénesis. Este marcador es un marcador de astrocitos. Puesto que los astrocitos se consideran células madre en la neurogénesis puede utilizarse como marcador de células tipo B en SVZ y tipo 1 en la SGZ del giro dentado, es decir células neurales progenitoras proliferativas. Sin embargo, para poder hacer esta asunción con cierta seguridad es necesario comprobar si el marcador co-localiza o no con los otros anticuerpos que marcan estas mismas fases celulares. Esta dificultad técnica sin embargo es una limitación general para este tipo de estudios de neurogénesis, y aunque la combinación de diferentes marcadores la minimiza, es imposible eliminarla totalmente (imagen 7).

Como nuestro proyecto se realiza en tejidos de necropsia tan sólo disponemos de los datos de la proliferación de los diferentes tipos celulares, pero nuestro diseño no permite conocer qué ocurre en las otras fases. Fundamentalmente no podemos obtener datos sobre la supervivencia de las neuronas recién formadas que es para la mayoría de los autores es la fase sobre la que más actúan los factores externos (Charalampopoulos *et al.* 2008). Tampoco nos permite saber si las nuevas neuronas migran o no, si se integran o no y si se convierten en neuronas motoras funcionales o no y en qué porcentaje lo hacen. Es decir, nuestro trabajo permite sólo ofrecer una visión de la fase más inicial de la neurogénesis pero no nos permite saber que ocurriría tras ella. Para tener esta información de nuevo sería necesario realizar un estudio *in vivo* en humanos con técnicas de neuroimagen o en modelos animales, con las dificultades previamente señaladas.

Los estudios de necropsia se realizan tras un periodo *postmortem* variable pero que en algún caso llegó hasta las 6 horas. Se sabe que las alteraciones de la neurogénesis pueden variar por fenómenos ocurridos tras la muerte del paciente. Por otro lado la conservación *postmortem* prolongada reduce la fiabilidad de los resultados obtenidos. Igualmente la fijación por métodos habituales (en formol) puede artefactar en alguna medida los estudios de neurogénesis. Mejoraría mucho la calidad del estudio conseguir una muestra con un menor tiempo hasta la necropsia o, al menos, que este fuese más homogéneo. No obstante dado que en nuestro centro no se dispone de personal para realizar la extracción de los tejidos las 24 horas es una variable de difícil modificación.

Nuestro estudio se ha centrado en los nichos neurogénicos clásicos y no evalúa otros nichos no clásicos que potencialmente podrían estar alterados. De hecho, la mayor parte de los estudios en modelo animal se han centrado en la activación del nicho medular (Warita *et al.* 2001, Chi *et al.* 2006, Guan *et al.* 2007). En nuestro caso disponíamos de tejido de médula espinal en tan sólo uno de los controles lo que no nos permitió realizar este estudio. Es cierto además que en la literatura se discute la verdadera existencia de este nicho en el humano, incluso de que estirpe son las células madre en él (García-Ovejero *et al.* 2015, Alfaro-Cervello *et al.* 2014) No obstante, un estudio que incluyese todos los

potenciales nichos neurogénicos daría una visión más completa de como se encuentra alterada la neurogénesis en la ELA.

Nuestra muestra tiene un tamaño reducido, aunque es similar a la de los estudios en humanos con otras enfermedades neurodegenerativas (van den Berge *et al.* 2011, Crews *et al.* 2010a, Curtis *et al.* 2003), pero el problema del tamaño de la muestra es especialmente importante si consideramos los pacientes con demencia frontotemporal asociado, ya que al ser el tamaño de la muestra menor de tres no nos permite realizar estudios estadísticos fiables. Sería importante ampliar el estudio incluyendo más pacientes que asocien DFT. Aunque este problema podría haberse intentado solucionar mediante el uso de tejidos procedentes de bancos de cerebro dado que la recogida de datos clínicos en estos casos es muy variable (por proceder de distintos centros), decidimos restringir nuestro estudio a necropsias de pacientes seguidos en nuestro centro.

Las características de nuestra muestra no son las de la media de pacientes con ELA. Los pacientes de este trabajo tienen formas más graves, con una supervivencia menor y mayor porcentaje de formas bulbares. Las conclusiones del trabajo serían más aplicables a la patología general si el estudio se realiza con una muestra mayor pero también más representativa de la evolución habitual de la enfermedad, es decir, con mayor supervivencia y menor porcentaje de formas bulbares. Sin embargo, este hecho se debe a un sesgo de selección puesto que estos pacientes más graves tienen una mayor tendencia a la donación de tejidos por lo que la modificación del diseño del estudio no conseguiría mejorarlo.

Por último, algunos de los hallazgos encontrados, como la relación entre la TDP43 fosforilada y citoplasmática y la neurogénesis, la alta presencia de atrofia en la muestra, la presencia de síntomas psiquiátricos o de depósitos de amiloide en el hipocampo de los pacientes, no forman parte de los objetivos de nuestro estudio y por ello, el diseño del mismo no nos permite interpretarlas de una forma segura. Para interpretar estos estudios sería necesario diseñar estudios específicos para cada uno de estos hallazgos.

X. CONCLUSIONES

1. En las necropsias de esclerosis lateral amiotrófica observamos una alteración de la neurogénesis con respecto a los controles. Esta alteración tiene diferente sentido dependiendo del nicho neurogénico que analicemos: en la zona subventricular se encuentra aumentada y existe una diferenciación neuronal, en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo se encuentra reducida.

2. Hemos observado esta alteración en todas las fases de la neurogénesis, desde la fase de células neurales progenitoras proliferativas -tipo B (zona subventricular), tipo 1/tipo A (zona subgranular del giro dentado)- (las células menos diferenciadas), pasando por la fase de células neurales pluripotenciales -tipo C (zona subventricular) , tipo 2 /tipo D1 (zona subgranular del giro dentado)- hasta los neuroblastos -células tipo A (zona subventricular), tipo 3 /tipo D3 (zona subgranular del giro dentado)-. Existe además una modificación de las características de la citoarquitectura de ambos nichos neurogénicos.

3. Estas alteraciones son más intensas en los casos que asociaban a la enfermedad de neurona motora clínica de demencia frontotemporal. No se encuentra asociación con las otras variables clínicas ni de neuroimagen analizadas.

Conclusiones secundarias

- El porcentaje de TDP-43 citoplasmática se correlaciona de forma estadísticamente significativa con la alteración de la neurogénesis. Esta correlación es lineal y directa para la zona subventricular y exponencial e inversa para la zona subgranular del giro dentado.
- Más del 75% de nuestros pacientes tienen algún grado de atrofia en las pruebas de neuroimagen. Esta atrofia es de predominio frontal y temporal.
- Más del 50% de los pacientes de nuestra muestra presentan síntomas neuropsiquiátricos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdipranoto, A., S. Wu, S. Stayte y B. Vissel (2008) The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7, 187-210.
- Abrous, D. N., M. Koehl y M. Le Moal (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, 85, 523-69.
- Aggarwal, A. y Shashiraj (2006) Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Indian J Pediatr*; 73, 225-6.
- Agosta, F., S. Galantucci, G. Magnani, A. Marcone, D. Martinelli, M. Antonietta Volonte, N. Riva, S. Iannaccone, P. M. Ferraro, F. Caso, A. Chio, G. Comi, A. Falini y M. Filippi (2015) MRI signatures of the frontotemporal lobar degeneration continuum. *Hum Brain Mapp*, 36, 2602-14.
- Ahlskog, J. E., S. C. Waring, R. C. Petersen, C. Esteban-Santillan, U. K. Craig, P. C. O'Brien, M. F. Plevak y L. T. Kurland (1998) Olfactory dysfunction in Guamanian ALS, parkinsonism, and dementia. *Neurology*, 51, 1672-7.
- Alfaro-Cervello, C., A. Cebrian-Silla, M. Soriano-Navarro, P. Garcia-Tarraga, J. Matias-Guiu, U. Gomez-Pinedo, P. Molina Aguilar, A. Alvarez-Buylla, M. R. Luquin y J. M. Garcia-Verdugo (2014) The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *J Comp Neurol*, 522, 1800-17.
- Almeida, S., E. Gascon, H. Tran, H. J. Chou, T. F. Gendron, S. Degroot, A. R. Tapper, C. Sellier, N. Charlet-Berguerand, A. Karydas, W. W. Seeley, A. L. Boxer, L. Petrucelli, B. L. Miller y F. B. Gao (2013) Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol*, 126, 385-99.
- Altman, J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135, 1127-8.
- Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol*, 136, 269-93.
- Altman, J. y G. D. Das (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124, 319-35.
- Alvarez-Buylla, A. y J. M. Garcia-Verdugo (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 22, 629-34.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo, A. S. Mateo y H. Merchant-Larios (1998) Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci*, 18, 1020-37.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo y A. D. Tramontin (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*, 2, 287-93.
- Alvarez-Buylla, A. y D. A. Lim (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41, 683-6.
- Alves, C. J., R. Dariolli, F. M. Jorge, M. R. Monteiro, J. R. Maximino, R. S. Martins, B. E. Strauss, J. E. Krieger, D. Callegaro y G. Chadi (2015) Gene expression profiling for human iPS-derived motor neurons from sporadic ALS patients reveals a strong association between mitochondrial functions and neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*, 9, 289.

- Ambrogini, P., L. Orsini, C. Mancini, P. Ferri, S. Ciaroni y R. Cuppini (2004) Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 359, 13-6.
- Amrein, I. y H. P. Lipp (2009) Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history. *Biol Lett*, 5, 141-4.
- Andersen, P. M., G. D. Borasio, R. Dengler, O. Hardiman, K. Kollewé, P. N. Leigh, P. F. Pradat, V. Silani y B. Tomik (2007) Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. *Amyotroph Lateral Scler*, 8, 195-213.
- Arbab, A. S., W. Liu y J. A. Frank (2006) Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects. *Expert Rev Med Devices*, 3, 427-39.
- Armstrong, R. J. y R. A. Barker (2001) Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration? *Lancet*, 358, 1174-6.
- Arnold, S. E., K. Talbot y C. G. Hahn (2005) Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res*, 147, 319-45.
- Badayan, I. y M. E. Cudkowicz (2008) Is it too soon for mesenchymal stem cell trials in people with ALS? *Amyotroph Lateral Scler*, 9, 321-2.
- Baralle, M., E. Buratti y F. E. Baralle (2013) The role of TDP-43 in the pathogenesis of ALS and FTL. *Biochem Soc Trans*, 41, 1536-40.
- Barkho, B. Z. y X. Zhao (2011) Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. *Curr Stem Cell Res Ther*, 6, 327-38.
- Basso, M., S. Pozzi, M. Tortarolo, F. Fiordaliso, C. Bisighini, L. Pasetto, G. Spaltro, D. Lidonnici, F. Gensano, E. Battaglia, C. Bendotti y V. Bonetto (2013) Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 288, 15699-711.
- Beeldman, E., J. Raaphorst, M. Klein Twennaar, M. de Visser, B. A. Schmand y R. J. de Haan (2015) The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Bellingham, M. C. (2011) A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neurosci Ther*, 17, 4-31.
- Belluzzi, O., M. Benedusi, J. Ackman y J. J. LoTurco (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 23, 10411-8.
- Benito-Leon, J. (2014) Essential tremor: a neurodegenerative disease? *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 4, 252.
- Benito-Leon, J., E. D. Louis, A. Sanchez-Ferro y F. Bermejo-Pareja (2013) Rate of cognitive decline during the premotor phase of essential tremor: a prospective study. *Neurology*, 81, 60-6.
- Bilsland, L. G., E. Sahai, G. Kelly, M. Golding, L. Greensmith y G. Schiavo (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20523-8.
- Bizon, J. L. y M. Gallagher (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci*, 18, 215-9.

- Blasco, H., S. Mavel, P. Corcia y P. H. Gordon (2014) The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem*, 21, 3551-75.
- Boekhoorn, K., M. Joels y P. J. Lucassen (2006) Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis*, 24, 1-14.
- Bogaert, E., C. d'Ydewalle y L. Van Den Bosch (2010) Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 297-304.
- Boillee, S., C. Vande Velde y D. W. Cleveland (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39-59.
- Bondolfi, L., F. Ermini, J. M. Long, D. K. Ingram y M. Jucker (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging*, 25, 333-40.
- Bonfanti, L. y P. Peretto (2011) Adult neurogenesis in mammals--a theme with many variations. *Eur J Neurosci*, 34, 930-50.
- Borta, A. y G. U. Hoglinger (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem*, 100, 587-95.
- Bossers, K., K. T. Wirz, G. F. Meerhoff, A. H. Essing, J. W. van Dongen, P. Houba, C. G. Kruse, J. Verhaagen y D. F. Swaab (2010) Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain*, 133, 3699-723.
- Brandt, M. D., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, K. Reuter, A. Bick-Sander, W. von der Behrens y G. Kempermann (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24, 603-13.
- Brettschneider, J., K. Del Tredici, J. B. Toledo, J. L. Robinson, D. J. Irwin, M. Grossman, E. Suh, V. M. Van Deerlin, E. M. Wood, Y. Baek, L. Kwong, E. B. Lee, L. Elman, L. McCluskey, L. Fang, S. Feldengut, A. C. Ludolph, V. M. Lee, H. Braak y J. Q. Trojanowski (2013) Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 74, 20-38.
- Brinton, R. D. y J. M. Wang (2006a) Preclinical analyses of the therapeutic potential of allopregnanolone to promote neurogenesis in vitro and in vivo in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 3, 11-7.
- Brinton, R. D. y J. M. Wang (2006b) Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr Alzheimer Res*, 3, 185-90.
- Brooks, B. R., R. G. Miller, M. Swash y T. L. Munsat (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1, 293-9.
- Carlesimo, G. A., F. Piras, F. Assogna, F. E. Pontieri, C. Caltagirone y G. Spalletta (2012) Hippocampal abnormalities and memory deficits in Parkinson disease: a multimodal imaging study. *Neurology*, 78, 1939-45.
- Carluer, L., A. Mondou, M. S. Buhour, M. Laisney, A. Pelerin, F. Eustache, F. Viader y B. Desgranges (2015) Neural substrate of cognitive theory of mind impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Cortex*, 65, 19-30.

- Cerami, C., A. Dodich, N. Canessa, C. Crespi, S. Iannaccone, M. Corbo, C. Lunetta, M. Consonni, E. Scola, A. Falini y S. F. Cappa (2014) Emotional empathy in amyotrophic lateral sclerosis: a behavioural and voxel-based morphometry study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 15, 21-9.
- Chang, A., M. C. Smith, X. Yin, R. J. Fox, S. M. Staugaitis y B. D. Trapp (2008) Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. *Brain*, 131, 2366-75.
- Charalampopoulos, I., E. Remboutsika, A. N. Margioris y A. Gravanis (2008) Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 300-7.
- Cherubini, A., I. Spoletini, P. Peran, G. Luccichenti, M. Di Paola, G. Sancesario, W. Gianni, F. Giubilei, P. Bossu, U. Sabatini, C. Caltagirone y G. Spalletta (2010) A multimodal MRI investigation of the subventricular zone in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*, 469, 214-8.
- Chew, J., T. F. Gendron, M. Prudencio, H. Sasaguri, Y. J. Zhang, M. Castanedes-Casey, C. W. Lee, K. Jansen-West, A. Kurti, M. E. Murray, K. F. Bieniek, P. O. Bauer, E. C. Whitelaw, L. Rousseau, J. N. Stankowski, C. Stetler, L. M. Daugherty, E. A. Perkinson, P. Desaro, A. Johnston, K. Overstreet, D. Edbauer, R. Rademakers, K. B. Boylan, D. W. Dickson, J. D. Fryer y L. Petrucelli (2015) Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*, 348, 1151-4.
- Chi, L., L. Gan, C. Luo, L. Lien y R. Liu (2007) Temporal response of neural progenitor cells to disease onset and progression in amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mice. *Stem Cells Dev*, 16, 579-88.
- Chi, L., Y. Ke, C. Luo, B. Li, D. Gozal, B. Kalyanaraman y R. Liu (2006) Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells*, 24, 34-43.
- Chin, B. B., Y. Nakamoto, J. W. Bulte, M. F. Pittenger, R. Wahl y D. L. Kraitchman (2003) ¹¹¹In oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nucl Med Commun*, 24, 1149-54.
- Chio, A., G. Logroscino, O. Hardiman, R. Swingler, D. Mitchell, E. Beghi y B. G. Traynor (2009) Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*, 10, 310-23.
- Cho, S. R., A. Benraiss, E. Chmielnicki, A. Samdani, A. Economides y S. A. Goldman (2007) Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease. *J Clin Invest*, 117, 2889-902.
- Choi, S. H., K. Veeraghavalu, O. Lazarov, S. Marler, R. M. Ransohoff, J. M. Ramirez y S. S. Sisodia (2008) Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron*, 59, 568-80.
- Chung, K. M. y S. W. Yu (2013) Interplay between autophagy and programmed cell death in mammalian neural stem cells. *BMB Rep*, 46, 383-90.
- Cicchetti, F., R. E. Gross, J. W. Bulte, M. Owen, I. Chen, M. Saint-Pierre, X. Wang, M. Yu y A. L. Brownell (2007) Dual-modality in vivo monitoring of subventricular zone stem cell migration and metabolism. *Contrast Media Mol Imaging*, 2, 130-8.

- Ciura, S., S. Lattante, I. Le Ber, M. Latouche, H. Tostivint, A. Brice y E. Kabashi (2013) Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 74, 180-7.
- Coan, G. y C. S. Mitchell (2015) An Assessment of Possible Neuropathology and Clinical Relationships in 46 Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient Autopsies. *Neurodegener Dis*, 15, 301-12.
- Coatti, G. C., M. S. Beccari, T. R. Olavio, M. Mitne-Neto, O. K. Okamoto y M. Zatz (2015) Stem cells for amyotrophic lateral sclerosis modeling and therapy: myth or fact? *Cytometry A*, 87, 197-211.
- Corotto, F. S., J. R. Henegar y J. A. Maruniak (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience*, 61, 739-44.
- Costa, J., C. Gomes y M. de Carvalho (2010) Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 764-78.
- Crespel, A., M. Baldy-Moulinier y M. Lerner Natoli (2004) [Neurogenesis in the adult brain: the demise of a dogma and the advent of new treatments]. *Rev Neurol (Paris)*, 160, 1150-8.
- Crews, L., A. Adame, C. Patrick, A. Delaney, E. Pham, E. Rockenstein, L. Hansen y E. Masliah (2010a) Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci*, 30, 12252-62.
- Crews, L., E. Rockenstein y E. Masliah (2010b) APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct*, 214, 111-26.
- Cudkowicz, M. E., J. Katz, D. H. Moore, G. O'Neill, J. D. Glass, H. Mitsumoto, S. Appel, B. Ravina, K. Kieburtz, I. Shoulson, P. Kaufmann, J. Khan, E. Simpson, J. Shefner, B. Levin, V. Cwik, D. Schoenfeld, S. Aggarwal, M. P. McDermott y R. G. Miller (2010) Toward more efficient clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 11, 259-65.
- Curtis, M. A., P. S. Eriksson y R. L. Faull (2007a) Progenitor cells and adult neurogenesis in neurodegenerative diseases and injuries of the basal ganglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 528-32.
- Curtis, M. A., R. L. Faull y P. S. Eriksson (2007b) The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat Rev Neurosci*, 8, 712-23.
- Curtis, M. A., M. Kam, U. Nannmark, M. F. Anderson, M. Z. Axell, C. Wikkelsø, S. Holtas, W. M. van Roon-Mom, T. Bjork-Eriksson, C. Nordborg, J. Frisen, M. Dragunow, R. L. Faull y P. S. Eriksson (2007c) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 315, 1243-9.
- Curtis, M. A., E. B. Penney, A. G. Pearson, W. M. van Roon-Mom, N. J. Butterworth, M. Dragunow, B. Connor y R. L. Faull (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9023-7.
- Curtis, M. A., E. B. Penney, J. Pearson, M. Dragunow, B. Connor y R. L. Faull (2005) The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neuroscience*, 132, 777-88.

- de Carvalho, M., S. Pinto, J. Costa, T. Evangelista, B. Ohana y A. Pinto (2010) A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 11, 456-60.
- DeLoach, A., M. Cozart, A. Kiaei y M. Kiaei (2015) A retrospective review of the progress in amyotrophic lateral sclerosis drug discovery over the last decade and a look at the latest strategies. *Expert Opin Drug Discov*, 1-20.
- Di Carlo, V., E. Grossi, P. Laneve, M. Morlando, S. Dini Modigliani, M. Ballarino, I. Bozzoni y E. Caffarelli (2013) TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Mol Neurobiol*, 48, 952-63.
- Dobrossy, M. D., E. Drapeau, C. Aurousseau, M. Le Moal, P. V. Piazza y D. N. Abrous (2003) Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry*, 8, 974-82.
- Doetsch, F. y A. Alvarez-Buylla (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14895-900.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 703-16.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17, 5046-61.
- Doetsch, F., L. Petreanu, I. Caille, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36, 1021-34.
- Dong, H., B. Goico, M. Martin, C. A. Csernansky, A. Bertchume y J. G. Csernansky (2004) Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*, 127, 601-9.
- Donovan, M. H., U. Yazdani, R. D. Norris, D. Games, D. C. German y A. J. Eisch (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, 495, 70-83.
- Drapeau, E., W. Mayo, C. Aurousseau, M. Le Moal, P. V. Piazza y D. N. Abrous (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14385-90.
- Droppelmann, C. A., D. Campos-Melo, M. Ishtiaq, K. Volkening y M. J. Strong (2014) RNA metabolism in ALS: when normal processes become pathological. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 15, 321-36.
- Egawa, N., S. Kitaoka, K. Tsukita, M. Naitoh, K. Takahashi, T. Yamamoto, F. Adachi, T. Kondo, K. Okita, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, Y. Yamada, A. Morizane, J. Takahashi, T. Ayaki, H. Ito, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, D. Watanabe, H. Hioki, T. Kaneko, K. Makioka, K. Okamoto, H. Takuma, A. Tamaoka, K. Hasegawa, T. Nonaka, M. Hasegawa, A. Kawata, M. Yoshida, T. Nakahata, R. Takahashi, M. C. Marchetto, F. H. Gage, S. Yamanaka y H. Inoue (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*, 4, 145ra104.

- Emde, A., C. Eitan, L. L. Liou, R. T. Libby, N. Rivkin, I. Magen, I. Reichenstein, H. Oppenheim, R. Eilam, A. Silvestroni, B. Alajajian, I. Z. Ben-Dov, J. Aebischer, A. Savidor, Y. Levin, R. Sons, S. M. Hammond, J. M. Ravits, T. Moller y E. Hornstein (2015) Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J*.
- Ernst, A., K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, S. Perl, J. Tisdale, G. Possnert, H. Druid y J. Frisen (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156, 1072-83.
- Farivar, S., Z. Mohamadzade, R. Shiari y A. Fahimzad (2015) Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. *Iran J Child Neurol*, 9, 87-93.
- Fedele, V., L. Roybon, U. Nordstrom, J. Y. Li y P. Brundin (2011) Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1. *Neuroscience*, 173, 76-81.
- Ferrari, R., D. Kapogiannis, E. D. Huey y P. Momeni (2011) FTD and ALS: A Tale of Two Diseases. *Curr Alzheimer Res*.
- Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, K. Reuter, B. Steiner, L. P. Wang, M. Yamaguchi, H. Kettenmann y G. Kempermann (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 23, 373-82.
- Foltynie, T. (2015) Can Parkinson's disease be cured by stimulating neurogenesis? *J Clin Invest*, 125, 978-80.
- Fornai, F., P. Longone, M. Ferrucci, P. Lenzi, C. Isidoro, S. Ruggieri y A. Paparelli (2008) Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy*, 4, 527-30.
- Frakes, A. E., L. Ferraiuolo, A. M. Haidet-Phillips, L. Schmelzer, L. Braun, C. J. Miranda, K. J. Ladner, A. K. Bevan, K. D. Foust, J. P. Godbout, P. G. Popovich, D. C. Guttridge y B. K. Kaspar (2014) Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 81, 1009-23.
- Frielingsdorf, H., K. Schwarz, P. Brundin y P. Mohapel (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10177-82.
- Frisen, J., C. B. Johansson, C. Torok, M. Risling y U. Lendahl (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol*, 131, 453-64.
- Gage, F. H., P. W. Coates, T. D. Palmer, H. G. Kuhn, L. J. Fisher, J. O. Suhonen, D. A. Peterson, S. T. Suhr y J. Ray (1995a) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11879-83.
- Gage, F. H., J. Ray y L. J. Fisher (1995b) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 18, 159-92.
- Galan, L., U. Gomez-Pinedo, A. Vela-Souto, A. Guerrero-Sola, J. A. Barcia, A. R. Gutierrez, A. Martinez-Martinez, M. S. Jimenez, J. M. Garcia-Verdugo y J. Matias-Guiu (2011) Subventricular zone in motor neuron disease with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett*, 499, 9-13.

- Galan, L., A. Guerrero-Sola, U. Gomez-Pinedo y J. Matias-Guiu (2010) [Cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: science and controversy]. *Neurologia*, 25, 467-9.
- Galan, L., A. Vela, A. Guerrero, J. A. Barcia, J. M. Garcia-Verdugo y J. Matias-Guiu (2007) [Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia*, 22, 381-8.
- Galea, L. A., M. D. Spritzer, J. M. Barker y J. L. Pawluski (2006) Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*, 16, 225-32.
- Galvan, V. y D. E. Bredesen (2007) Neurogenesis in the adult brain: implications for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6, 303-10.
- Garcia, A. D., N. B. Doan, T. Imura, T. G. Bush y M. V. Sofroniew (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7, 1233-41.
- Garcia-Ovejero, D., A. Arevalo-Martin, B. Paniagua-Torija, J. Florensa-Vila, I. Ferrer, L. Grassner y E. Molina-Holgado (2015) The ependymal region of the adult human spinal cord differs from other species and shows ependymoma-like features. *Brain*, 138, 1583-97.
- Garcia-Redondo, A., O. Dols-Icardo, R. Rojas-Garcia, J. Esteban-Perez, P. Cordero-Vazquez, J. L. Munoz-Blanco, I. Catalina, M. Gonzalez-Munoz, L. Varona, E. Sarasola, M. Povedano, T. Sevilla, A. Guerrero, J. Pardo, A. Lopez de Munain, C. Marquez-Infante, F. J. de Rivera, P. Pastor, I. Jerico, A. A. de Arcaya, J. S. Mora, J. Clarimon, J. F. Gonzalo-Martinez, A. Juarez-Rufian, G. Atencia, R. Jimenez-Bautista, Y. Moran, J. Mascias, M. Hernandez-Barral, S. Kapetanovic, M. Garcia-Barcina, C. Alcala, A. Vela, C. Ramirez-Ramos, L. Galan, J. Perez-Tur, B. Quintans, M. J. Sobrido, R. Fernandez-Torron, J. J. Poza, A. Gorostidi, C. Paradas, P. Villoslada, P. Larrode, J. L. Capablo, J. Pascual-Calvet, M. Goni, Y. Morgado, M. Guitart, S. Moreno-Laguna, A. Rueda, C. Martin-Estefania, C. Cemillan, R. Blesa y A. Lleo (2013) Analysis of the C9orf72 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Spain and different populations worldwide. *Hum Mutat*, 34, 79-82.
- Garzon-Muvdi, T. y A. Quinones-Hinojosa (2009) Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR J*, 51, 3-23.
- Ge, S., E. L. Goh, K. A. Sailor, Y. Kitabatake, G. L. Ming y H. Song (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-93.
- Ge, S., C. H. Yang, K. S. Hsu, G. L. Ming y H. Song (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54, 559-66.
- Gil, J. M., P. Mohapel, I. M. Araujo, N. Popovic, J. Y. Li, P. Brundin y A. Petersen (2005) Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis*, 20, 744-51.
- Gilbert, P. E. y R. P. Kesner (2003) Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning. *Behav Neurosci*, 117, 1385-94.
- Goldstein, L. H. y S. Abrahams (2013) Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol*, 12, 368-80.

- Gomez-Nicola, D., S. Suzzi, M. Vargas-Caballero, N. L. Fransen, H. Al-Malki, A. Cebrian-Silla, J. M. Garcia-Verdugo, K. Riecken, B. Fehse y V. H. Perry (2014) Temporal dynamics of hippocampal neurogenesis in chronic neurodegeneration. *Brain*, 137, 2312-28.
- Gordon, P. H., D. H. Moore, R. G. Miller, J. M. Florence, J. L. Verheijde, C. Doorish, J. F. Hilton, G. M. Spitalny, R. B. MacArthur, H. Mitsumoto, H. E. Neville, K. Boylan, T. Mozaffar, J. M. Belsh, J. Ravits, R. S. Bedlack, M. C. Graves, L. F. McCluskey, R. J. Barohn y R. Tandan (2007) Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol*, 6, 1045-53.
- Goutman, S. A., K. S. Chen y E. L. Feldman (2015) Recent Advances and the Future of Stem Cell Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 12, 428-48.
- Goutman, S. A. y E. L. Feldman (2015) Clinical Trials of Therapies for Amyotrophic Lateral Sclerosis: One Size Does Not Fit All. *JAMA Neurol*, 72, 743-4.
- Grad, L. I., S. M. Fernando y N. R. Cashman (2015) From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 77, 257-65.
- Grote, H. E., N. D. Bull, M. L. Howard, A. van Dellen, C. Blakemore, P. F. Bartlett y A. J. Hannan (2005) Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. *Eur J Neurosci*, 22, 2081-8.
- Grote, H. E. y A. J. Hannan (2007) Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 533-45.
- Guan, Y. J., X. Wang, H. Y. Wang, K. Kawagishi, H. Ryu, C. F. Huo, E. M. Shimony, B. S. Kristal, H. G. Kuhn y R. M. Friedlander (2007) Increased stem cell proliferation in the spinal cord of adult amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *J Neurochem*, 102, 1125-38.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H. X. Deng y et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-5.
- Hagg, T. (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*, 28, 589-95.
- Haidet-Phillips, A. M. y N. J. Maragakis (2015) Neural and glial progenitor transplantation as a neuroprotective strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Brain Res*.
- Hajivalili, M., F. Pourgholi, H. S. Kafil, F. Jadidi-Niaragh y M. Yousefi (2015) Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther*.
- Hamilton, L. K., M. K. Truong, M. R. Bednarczyk, A. Aumont y K. J. Fernandes (2009) Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*, 164, 1044-56.
- Hamilton, R. L. y R. Bowser (2004) Alzheimer disease pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 107, 515-22.
- Hanson, N. D., C. B. Nemeroff y M. J. Owens (2011) Lithium, but not fluoxetine or the corticotropin-releasing factor receptor 1 receptor antagonist R121919, increases cell proliferation in the adult dentate gyrus. *J Pharmacol Exp Ther*, 337, 180-6.

- Harembaki, T., A. Deglincerti y A. H. Brivanlou (2015) Huntingtin is required for ciliogenesis and neurogenesis during early *Xenopus* development. *Dev Biol*.
- Haughey, N. J., D. Liu, A. Nath, A. C. Borchard y M. P. Mattson (2002) Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 1, 125-35.
- He, J., M. Mangelsdorf, D. Fan, P. Bartlett y M. A. Brown (2014) Amyotrophic Lateral Sclerosis Genetic Studies: From Genome-wide Association Mapping to Genome Sequencing. *Neuroscientist*.
- He, X. J., H. Nakayama, M. Dong, H. Yamauchi, M. Ueno, K. Uetsuka y K. Doi (2006) Evidence of apoptosis in the subventricular zone and rostral migratory stream in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 873-82.
- Healy, S. D. y J. R. Krebs (1993) Development of hippocampal specialisation in a food-storing bird. *Behav Brain Res*, 53, 127-31.
- Herrera, D. G., J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol*, 46, 867-77.
- Highley, J. R., J. Kirby, J. A. Jansweijer, P. S. Webb, C. A. Hewamadduma, P. R. Heath, A. Higginbottom, R. Raman, L. Ferraiuolo, J. Cooper-Knock, C. J. McDermott, S. B. Wharton, P. J. Shaw y P. G. Ince (2014) Loss of nuclear TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) causes altered expression of splicing machinery and widespread dysregulation of RNA splicing in motor neurones. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40, 670-85.
- Hinnell, C., C. S. Hurt, S. Landau, R. G. Brown y M. Samuel (2012) Nonmotor versus motor symptoms: how much do they matter to health status in Parkinson's disease? *Mov Disord*, 27, 236-41.
- Ho, N. F., J. M. Hooker, A. Sahay, D. J. Holt y J. L. Roffman (2013) In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Mol Psychiatry*, 18, 404-16.
- Hoglinger, G. U., P. Rizk, M. P. Muriel, C. Duyckaerts, W. H. Oertel, I. Caille y E. C. Hirsch (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 7, 726-35.
- Horner, P. J., A. E. Power, G. Kempermann, H. G. Kuhn, T. D. Palmer, J. Winkler, L. J. Thal y F. H. Gage (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 20, 2218-28.
- Hsieh, S., J. Caga, F. V. Leslie, M. Shibata, N. Daveson, D. Foxe, E. Ramsey, P. Lillo, R. M. Ahmed, E. Devenney, J. R. Burrell, J. R. Hodges, M. C. Kiernan y E. Mioshi (2015) Cognitive and Behavioral Symptoms in ALSFTD: Detection, Differentiation, and Progression. *J Geriatr Psychiatry Neurol*.
- Hugnot, J. P. y R. Franzen (2011) The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. *Front Biosci*, 16, 1044-59.
- Jaako-Movits, K. y A. Zharkovsky (2005) Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. *Eur J Neurosci*, 22, 2871-8.

- Jaako-Movits, K., T. Zharkovsky, M. Pedersen y A. Zharkovsky (2006) Decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy is reversed by repeated citalopram administration. *Cell Mol Neurobiol*, 26, 1559-70.
- Jessberger, S. y F. H. Gage (2014) Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. *Trends Cell Biol*, 24, 558-63.
- Jiao, J. y D. F. Chen (2008) Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells*, 26, 1221-30.
- Jin, K., Y. Sun, L. Xie, S. Batteur, X. O. Mao, C. Smelick, A. Logvinova y D. A. Greenberg (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell*, 2, 175-83.
- Johansson, A., H. Engler, G. Blomquist, B. Scott, A. Wall, S. M. Aquilonius, B. Langstrom y H. Askmark (2007) Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [11C](L)-deprenyl-D2 PET. *J Neurol Sci*, 255, 17-22.
- Johansson, C. B., S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl y J. Frisen (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34.
- Kaji, R., Y. Izumi, Y. Adachi y S. Kuzuhara (2012) ALS-parkinsonism-dementia complex of Kii and other related diseases in Japan. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S190-1.
- Kandasamy, M., S. Couillard-Despres, K. A. Raber, M. Stephan, B. Lehner, B. Winner, Z. Kohl, F. J. Rivera, H. P. Nguyen, O. Riess, U. Bogdahn, J. Winkler, S. von Horsten y L. Aigner (2010) Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 717-28.
- Kaneko, N. y K. Sawamoto (2009) Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res*, 63, 155-64.
- Kasper, E., C. Schuster, J. Machts, D. Bittner, S. Vielhaber, R. Benecke, S. Teipel y J. Prudlo (2015) Dysexecutive functioning in ALS patients and its clinical implications. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 16, 160-71.
- Kassubek, J., H. P. Muller, K. Del Tredici, J. Brettschneider, E. H. Pinkhardt, D. Lule, S. Bohm, H. Braak y A. C. Ludolph (2014) Diffusion tensor imaging analysis of sequential spreading of disease in amyotrophic lateral sclerosis confirms patterns of TDP-43 pathology. *Brain*, 137, 1733-40.
- Kato, S., H. Hayashi y A. Yagishita (1993) Involvement of the frontotemporal lobe and limbic system in amyotrophic lateral sclerosis: as assessed by serial computed tomography and magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci*, 116, 52-8.
- Katoh-Semba, R., T. Asano, H. Ueda, R. Morishita, I. K. Takeuchi, Y. Inaguma y K. Kato (2002) Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J*, 16, 1328-30.
- Kempermann, G. (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 22, 635-8.
- Kempermann, G., E. P. Brandon y F. H. Gage (1998) Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*, 8, 939-42.

- Kempermann, G., E. J. Chesler, L. Lu, R. W. Williams y F. H. Gage (2006) Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 780-5.
- Kempermann, G., D. Gast y F. H. Gage (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, 52, 135-43.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn y F. H. Gage (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-5.
- Kempermann, G., H. Song y F. H. Gage (2015) Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- Kisby, G., V. Palmer, M. Lasarev, R. Fry, M. Iordanov, E. Magun, L. Samson y P. Spencer (2011) Does the cycad genotoxin MAM implicated in Guam ALS-PDC induce disease-relevant changes in mouse brain that includes olfaction? *Commun Integr Biol*, 4, 731-4.
- Klaissle, P., A. Lesemann, P. Huehnchen, A. Hermann, A. Storch y B. Steiner (2012) Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. *BMC Neurosci*, 13, 132.
- Kohl, Z., M. Regensburger, R. Aigner, M. Kandasamy, B. Winner, L. Aigner y J. Winkler (2010) Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci*, 11, 114.
- Kong, Q., S. Carothers, Y. Chang y C. L. Glenn Lin (2012) The importance of preclinical trial timing - a potential reason for the disconnect between mouse studies and human clinical trials in ALS. *CNS Neurosci Ther*, 18, 791-3.
- Kriegstein, A. y A. Alvarez-Buylla (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- Kuge, A., S. Takemura, Y. Kokubo, S. Sato, K. Goto y T. Kayama (2009) Temporal profile of neurogenesis in the subventricular zone, dentate gyrus and cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *Neurol Res*, 31, 969-76.
- Kuhn, H. G., M. Biebl, D. Wilhelm, M. Li, R. M. Friedlander y J. Winkler (2005) Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 22, 1907-15.
- Kuhn, H. G., C. M. Cooper-Kuhn, K. Boekhoorn y P. J. Lucassen (2007) Changes in neurogenesis in dementia and Alzheimer mouse models: are they functionally relevant? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257, 281-9.
- Kumar, V., B. K. Singh, A. K. Chauhan, D. Singh, D. K. Patel y C. Singh (2015) Minocycline Rescues from Zinc-Induced Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration: Biochemical and Molecular Interventions. *Mol Neurobiol*.
- Kurt, A., F. Nijboer, T. Matuz y A. Kubler (2007) Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management. *CNS Drugs*, 21, 279-91.
- Laplagne, D. A., M. S. Esposito, V. C. Piatti, N. A. Morgenstern, C. Zhao, H. van Praag, F. H. Gage y A. F. Schinder (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*, 4, e409.

- Lazarini, F. y P. M. Lledo (2011) Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci*, 34, 20-30.
- Lazarov, O. y R. A. Marr (2010) Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol*, 223, 267-81.
- Lazic, S. E., H. Grote, R. J. Armstrong, C. Blakemore, A. J. Hannan, A. van Dellen y R. A. Barker (2004) Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport*, 15, 811-3.
- Lazic, S. E., H. E. Grote, C. Blakemore, A. J. Hannan, A. van Dellen, W. Phillips y R. A. Barker (2006) Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 23, 1829-38.
- Lemaire, V., M. Koehl, M. Le Moal y D. N. Abrous (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11032-7.
- Lemasson, M., A. Saghatelian, J. C. Olivo-Marin y P. M. Lledo (2005) Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, 25, 6816-25.
- Lepousez, G., A. Nissant y P. M. Lledo (2015) Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron*, 86, 387-401.
- Leuner, B., S. Mendolia-Loffredo, Y. Kozorovitskiy, D. Samburg, E. Gould y T. J. Shors (2004) Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci*, 24, 7477-81.
- Leventhal, C., S. Rafii, D. Rafii, A. Shahar y S. A. Goldman (1999) Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci*, 13, 450-64.
- Levine, T. D., R. Bowser, N. Hank y D. Saperstein (2010) A pilot trial of memantine and riluzole in ALS: correlation to CSF biomarkers. *Amyotroph Lateral Scler*, 11, 514-9.
- Lie, D. C., G. Dzieczapolski, A. R. Willhoite, B. K. Kaspar, C. W. Shults y F. H. Gage (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci*, 22, 6639-49.
- Lie, D. C., H. Song, S. A. Colamarino, G. L. Ming y F. H. Gage (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 399-421.
- Lim, D. A., Y. C. Huang y A. Alvarez-Buylla (2007) The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am*, 18, 81-92, ix.
- Liscic, R. M., L. T. Grinberg, J. Zidar, M. A. Gitcho y N. J. Cairns (2008) ALS and FTL: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol*, 15, 772-80.
- Liu, G. y Y. Rao (2003) Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 23, 6651-9.
- Liu, S., J. Wang, D. Zhu, Y. Fu, K. Lukowiak y Y. M. Lu (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 23, 732-6.
- Liu, Z. y L. J. Martin (2006) The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J Comp Neurol*, 497, 468-88.
- Lledo, P. M., M. Alonso y M. S. Grubb (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7, 179-93.

- Lois, C. y A. Alvarez-Buylla (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264, 1145-8.
- Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271, 978-81.
- Low, V. F., M. Dragunow, L. J. Tippett, R. L. Faull y M. A. Curtis (2011) No change in progenitor cell proliferation in the hippocampus in Huntington's disease. *Neuroscience*, 199, 577-88.
- Lucassen, P. J., C. A. Oomen, E. F. Naninck, C. P. Fitzsimons, A. M. van Dam, B. Czeh y A. Korosi (2015) Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- Luo, J., S. B. Daniels, J. B. Lenington, R. Q. Notti y J. C. Conover (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, 5, 139-52.
- Ma, D. K., G. L. Ming y H. Song (2005) Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 514-20.
- Ma, X., M. J. Hamadeh, B. R. Christie, J. A. Foster y M. A. Tarnopolsky (2012) Impact of treadmill running and sex on hippocampal neurogenesis in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 7, e36048.
- Mackenzie, I. R., E. H. Bigio, P. G. Ince, F. Geser, M. Neumann, N. J. Cairns, L. K. Kwong, M. S. Forman, J. Ravits, H. Stewart, A. Eisen, L. McClusky, H. A. Kretschmar, C. M. Monoranu, J. R. Highley, J. Kirby, T. Siddique, P. J. Shaw, V. M. Lee y J. Q. Trojanowski (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*, 61, 427-34.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler y R. S. Duman (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20, 9104-10.
- Mancuso, R. y X. Navarro (2015) Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol*.
- Manganas, L. N., X. Zhang, Y. Li, R. D. Hazel, S. D. Smith, M. E. Wagshul, F. Henn, H. Benveniste, P. M. Djuric, G. Enikolopov y M. Maletic-Savatic (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*, 318, 980-5.
- Mangiarini, L., K. Sathasivam, M. Seller, B. Cozens, A. Harper, C. Hetherington, M. Lawton, Y. Trottier, H. Lehrach, S. W. Davies y G. P. Bates (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87, 493-506.
- Martens, D. J., R. M. Seaberg y D. van der Kooy (2002) In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur J Neurosci*, 16, 1045-57.
- Marti-Fabregas, J., M. Romaguera-Ros, U. Gomez-Pinedo, S. Martinez-Ramirez, E. Jimenez-Xarrie, R. Marin, J. L. Marti-Vilalta y J. M. Garcia-Verdugo (2010) Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology*, 74, 357-365.

- Martinez, H. R., M. T. Gonzalez-Garza, J. E. Moreno-Cuevas, E. Caro, E. Gutierrez-Jimenez y J. J. Segura (2009) Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy*, 11, 26-34.
- Marxreiter, F., M. Regensburger y J. Winkler (2012) Adult neurogenesis in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci*.
- Matias-Guiu, J., J. A. Barcia, J. M. Garcia-Verdugo, L. Galan, A. Vela y R. Garcia-Ramos (2008) [Cellular therapy in amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia*, 23, 226-37.
- Matias-Guiu, J., L. Galan, R. Garcia-Ramos, J. A. Barcia y A. Guerrero (2010) [Cerebrospinal fluid cytotoxicity in lateral amyotrophic sclerosis]. *Neurologia*, 25, 364-73.
- Matias-Guiu, J., L. Galan, R. Garcia-Ramos, A. Vela y A. Guerrero (2007) [Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia*, 22, 368-80.
- Matsumoto, A., Y. Okada, M. Nakamichi, M. Nakamura, Y. Toyama, G. Sobue, M. Nagai, M. Aoki, Y. Itoyama y H. Okano (2006) Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res*, 83, 119-33.
- Mattei, D., A. Djodari-Irani, R. Hadar, A. Pelz, L. F. de Cossio, T. Goetz, M. Matyash, H. Kettenmann, C. Winter y S. A. Wolf (2014) Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain Behav Immun*, 38, 175-84.
- Mayo, W., V. Lemaire, J. Malaterre, J. J. Rodriguez, M. Cayre, M. G. Stewart, M. Kharouby, G. Rougon, M. Le Moal, P. V. Piazza y D. N. Abrous (2005) Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus. *Neurobiol Aging*, 26, 103-14.
- Mazzini, L., A. Vercelli, I. Ferrero, M. Boido, R. Cantello y F. Fagioli (2012) Transplantation of mesenchymal stem cells in ALS. *Prog Brain Res*, 201, 333-59.
- McKay, R. (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276, 66-71.
- McMillan, C. T., J. Russ, E. M. Wood, D. J. Irwin, M. Grossman, L. McCluskey, L. Elman, V. Van Deerlin y E. B. Lee (2015) C9orf72 promoter hypermethylation is neuroprotective: Neuroimaging and neuropathologic evidence. *Neurology*, 84, 1622-30.
- Meletis, K., F. Barnabe-Heider, M. Carlen, E. Evergren, N. Tomilin, O. Shupliakov y J. Frisen (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol*, 6, e182.
- Melrose, H. L., C. B. Kent, J. P. Taylor, J. C. Dachsel, K. M. Hinkle, S. J. Lincoln, S. S. Mok, J. G. Culvenor, C. L. Masters, G. M. Tyndall, D. I. Bass, Z. Ahmed, C. A. Andorfer, O. A. Ross, Z. K. Wszolek, A. Delldonne, D. W. Dickson y M. J. Farrer (2007) A comparative analysis of leucine-rich repeat kinase 2 (Lrrk2) expression in mouse brain and Lewy body disease. *Neuroscience*, 147, 1047-58.
- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch y A. Alvarez-Buylla (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 26, 7907-18.
- Mercier, F., J. T. Kitasako y G. I. Hatton (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol*, 451, 170-88.
- Merkle, F. T. y A. Alvarez-Buylla (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 704-9.

- Merkle, F. T., A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17528-32.
- Merrill, D. A., R. Karim, M. Darraq, A. A. Chiba y M. H. Tuszynski (2003) Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J Comp Neurol*, 459, 201-7.
- Miller, R. G., C. E. Jackson, E. J. Kasarskis, J. D. England, D. Forsheew, W. Johnston, S. Kalra, J. S. Katz, H. Mitsumoto, J. Rosenfeld, C. Shoesmith, M. J. Strong y S. C. Woolley (2009) Practice parameter update: The care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 73, 1218-26.
- Miller, R. G., J. D. Mitchell, M. Lyon y D. H. Moore (2007) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.
- Ming, G. L. y H. Song (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 223-50.
- Mirochnic, S., S. Wolf, M. Staufenbiel y G. Kempermann (2009) Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*, 19, 1008-18.
- Mitchell, J. D. y G. D. Borasio (2007) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 369, 2031-41.
- Mitsumoto, H., B. R. Brooks y V. Silani (2014) Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol*, 13, 1127-38.
- Mizuno, Y., Y. Fujita, M. Takatama y K. Okamoto (2011) Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 302, 14-8.
- Mizuta, I., M. Ohta, K. Ohta, M. Nishimura, E. Mizuta y S. Kuno (2001) Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. *Neurosci Lett*, 310, 117-20.
- Mohapel, P., H. Frielingsdorf, J. Haggblad, O. Zachrisson y P. Brundin (2005) Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience*, 132, 767-76.
- Mohapel, P., K. Mundt-Petersen, P. Brundin y H. Frielingsdorf (2006) Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 142, 609-13.
- Molofsky, A. V., S. G. Slutsky, N. M. Joseph, S. He, R. Pardal, J. Krishnamurthy, N. E. Sharpless y S. J. Morrison (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443, 448-52.
- Moon, M., M. Y. Cha y I. Mook-Jung (2014) Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis*, 41, 233-41.
- Morest, D. K. (1970) A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 130, 265-305.

- Morris, R. G. (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*, 23, 2829-46.
- Morrison, K. E., S. Dhariwal, R. Hornabrook, L. Savage, D. J. Burn, T. K. Khoo, J. Kelly, C. L. Murphy, A. Al-Chalabi, A. Dougherty, P. N. Leigh, L. Wijesekera, M. Thornhill, C. M. Ellis, K. O'Hanlon, J. Panicker, L. Pate, P. Ray, L. Wyatt, C. A. Young, L. Copeland, J. Ealing, H. Hamdalla, I. Leroi, C. Murphy, F. O'Keeffe, E. Oughton, L. Partington, P. Paterson, D. Rog, A. Sathish, D. Sexton, J. Smith, H. Vanek, S. Dodds, T. L. Williams, I. N. Steen, J. Clarke, C. Eziefula, R. Howard, R. Orrell, K. Sidle, R. Sylvester, W. Barrett, C. Merritt, K. Talbot, M. R. Turner, C. Whatley, C. Williams, J. Williams, C. Cosby, C. O. Hanemann, I. Iman, C. Philips, L. Timings, S. E. Crawford, C. Hewamadduma, R. Hibberd, H. Hollinger, C. McDermott, G. Mils, M. Rafiq, P. J. Shaw, A. Taylor, E. Waines, T. Walsh, R. Addison-Jones, J. Birt, M. Hare y T. Majid (2013) Lithium in patients with amyotrophic lateral sclerosis (LiCALS): a phase 3 multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 12, 339-45.
- Morshead, C. M. y D. van der Kooy (1992) Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci*, 12, 249-56.
- Mu, Y., S. W. Lee y F. H. Gage (2010) Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 20, 416-23.
- Muller, M. B., P. J. Lucassen, A. Yassouridis, W. J. Hoogendijk, F. Holsboer y D. F. Swaab (2001) Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *Eur J Neurosci*, 14, 1603-12.
- Nadri, C., B. Dean, E. Scarr y G. Agam (2004) GSK-3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Res*, 71, 377-82.
- Nagahara, A. H. y M. H. Tuszynski (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 209-19.
- Nagai, M., D. B. Re, T. Nagata, A. Chalazonitis, T. M. Jessell, H. Wichterle y S. Przedborski (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*, 10, 615-22.
- Nakanishi, M., T. Niidome, S. Matsuda, A. Akaike, T. Kihara y H. Sugimoto (2007) Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci*, 25, 649-58.
- Nakayama, T. y T. Sawada (2002) Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicine. *Pharmacol Biochem Behav*, 71, 119-38.
- Namba, T., M. Maekawa, S. Yuasa, S. Kohsaka y S. Uchino (2009) The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in adult hippocampus. *Glia*, 57, 1082-90.
- Nanry, K. P., W. R. Mundy y H. A. Tilson (1989) Colchicine-induced alterations of reference memory in rats: role of spatial versus non-spatial task components. *Behav Brain Res*, 35, 45-53.
- Nathan, P. J., S. R. Cobb, B. Lu, E. T. Bullmore y C. H. Davies (2011) Studying synaptic plasticity in the human brain and opportunities for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*, 11, 540-8.

- Navone, F., P. Genevini y N. Borgese (2015) Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS. *Cells*, 4, 354-86.
- Ninkovic, J. y M. Gotz (2007) Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, 17, 338-44.
- Nottebohm, F. (1989) From bird song to neurogenesis. *Sci Am*, 260, 74-9.
- Nottebohm, F. (2002) Why are some neurons replaced in adult brain? *J Neurosci*, 22, 624-8.
- Oh, K. W., C. Moon, H. Y. Kim, S. I. Oh, J. Park, J. H. Lee, I. Y. Chang, K. S. Kim y S. H. Kim (2015) Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*, 4, 590-7.
- Ohab, J. J., S. Fleming, A. Blesch y S. T. Carmichael (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*, 26, 13007-16.
- Okamoto, Y., M. Ihara, M. Urushitani, H. Yamashita, T. Kondo, A. Tanigaki, M. Oono, J. Kawamata, A. Ikemoto, Y. Kawamoto, R. Takahashi y H. Ito (2011) An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology*, 77, 1993-5.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite y F. H. Gage (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425, 479-94.
- Parent, J. M., R. C. Elliott, S. J. Pleasure, N. M. Barbaro y D. H. Lowenstein (2006) Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 59, 81-91.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, L. J. Freedman y M. B. Luskin (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*, 172, 1-16.
- Peron, S. y B. Berninger (2015) Reawakening the sleeping beauty in the adult brain: neurogenesis from parenchymal glia. *Curr Opin Genet Dev*, 34, 46-53.
- Perrin, S. (2014) Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature*, 507, 423-5.
- Peters, O. M., M. Ghasemi y R. H. Brown, Jr. (2015) Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *J Clin Invest*, 125, 1767-79.
- Petreaanu, L. y A. Alvarez-Buylla (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 22, 6106-13.
- Phillips, W., A. J. Morton y R. A. Barker (2005) Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *J Neurosci*, 25, 11564-76.
- Picard-Riera, N., L. Decker, C. Delarasse, K. Goude, B. Nait-Oumesmar, R. Liblau, D. Pham-Dinh y A. Baron-Van Evercooren (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13211-6.
- Pirooznia, S. K., V. L. Dawson y T. M. Dawson (2014) Motor neuron death in ALS: programmed by astrocytes? *Neuron*, 81, 961-3.
- Pirotte, D. y B. Rogister (2008) [Adult neurogenesis or the falling of a dogma]. *Rev Med Liege*, 63, 245-50.
- Plumpe, T., D. Ehninger, B. Steiner, F. Klempin, S. Jessberger, M. Brandt, B. Romer, G. R. Rodriguez, G. Kronenberg y G. Kempermann (2006) Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*, 7, 77.

- Pringsheim, T., K. Wiltshire, L. Day, J. Dykeman, T. Steeves y N. Jette (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 27, 1083-91.
- Pupillo, E., P. Messina, G. Logroscino y E. Beghi (2014) Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Ann Neurol*, 75, 287-97.
- Quinones-Hinojosa, A. y K. Chaichana (2007) The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors. *Exp Neurol*, 205, 313-24.
- Quinones-Hinojosa, A., N. Sanai, O. Gonzalez-Perez y J. M. Garcia-Verdugo (2007) The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am*, 18, 15-20, vii.
- Quinones-Hinojosa, A., N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M. S. Berger, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*, 494, 415-34.
- Raaphorst, J., M. J. van Tol, M. de Visser, A. J. van der Kooi, C. B. Majoie, L. H. van den Berg, B. Schmand y D. J. Veltman (2015) Prose memory impairment in amyotrophic lateral sclerosis patients is related to hippocampus volume. *Eur J Neurol*, 22, 547-54.
- Radakovic, R., L. Stephenson, S. Colville, R. Swingle, S. Chandran y S. Abrahams (2015) Multidimensional apathy in ALS: validation of the Dimensional Apathy Scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Radunovic, A., D. Annane, M. K. Rafiq y N. Mustfa (2013) Mechanical ventilation for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD004427.
- Ramon y Cajal, S. 1928. Degeneration y Regeneration of the Nervous System. New York.
- Ravits, J., S. Appel, R. H. Baloh, R. Barohn, B. R. Brooks, L. Elman, M. K. Floeter, C. Henderson, C. Lomen-Hoerth, J. D. Macklis, L. McCluskey, H. Mitsumoto, S. Przedborski, J. Rothstein, J. Q. Trojanowski, L. H. van den Berg y S. Ringel (2013) Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14 Suppl 1, 5-18.
- Ravits, J. M. y A. R. La Spada (2009) ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*, 73, 805-11.
- Re, D. B., V. Le Verche, C. Yu, M. W. Amoroso, K. A. Politi, S. Phani, B. Ikiz, L. Hoffmann, M. Koolen, T. Nagata, D. Papadimitriou, P. Nagy, H. Mitsumoto, S. Kariya, H. Wichterle, C. E. Henderson y S. Przedborski (2014) Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*, 81, 1001-8.
- Reif, A., S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, M. Lauer, A. Schmitt y K. P. Lesch (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, 11, 514-22.
- Ribeiro Xavier, A. L., B. T. Kress, S. A. Goldman, J. R. Lacerda de Menezes y M. Nedergaard (2015) A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci*, 35, 11848-61.

- Richard, J. P. y N. J. Maragakis (2015) Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Res*, 1607, 15-25.
- Rietze, R., P. Poulin y S. Weiss (2000) Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 424, 397-408.
- Rocheffort, C., G. Gheusi, J. D. Vincent y P. M. Lledo (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, 22, 2679-89.
- Rodriguez de Rivera, F. J., M. Grande, J. Garcia-Caballero, J. Munoz-Blanco, J. Mora, J. Esteban, A. Guerrero, J. Matias-Guiu, R. de Andres-Colsa, C. Buey y E. Diez-Tejedor (2007) [Development of a clinical pathway for the attention of patients with amyotrophic lateral sclerosis in a regional network. ALS Assistance Network-Comunidad de Madrid]. *Neurologia*, 22, 354-61.
- Rodriguez, J. J., V. C. Jones, M. Tabuchi, S. M. Allan, E. M. Knight, F. M. LaFerla, S. Oddo y A. Verkhratsky (2008) Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 3, e2935.
- Rodriguez, J. J., V. C. Jones y A. Verkhratsky (2009) Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. *Neuroreport*, 20, 907-12.
- Rooney, J., S. Byrne, M. Heverin, K. Tobin, A. Dick, C. Donaghy y O. Hardiman (2015) A multidisciplinary clinic approach improves survival in ALS: a comparative study of ALS in Ireland and Northern Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86, 496-501.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H. X. Deng y et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- Rosenzweig, M. R. y E. L. Bennett (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res*, 78, 57-65.
- Rothstein, J. D. (2009) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 65 Suppl 1, S3-9.
- Rowland, L. P. (2001) How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch Neurol*, 58, 512-5.
- Rowland, L. P. y N. A. Shneider (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 344, 1688-700.
- Sabatelli, M., M. Zollino, A. Conte, A. Del Grande, G. Marangi, M. Lucchini, M. Mirabella, A. Romano, R. Piacentini, G. Bisogni, S. Lattante, M. Luigetti, P. M. Rossini y A. Moncada (2015) Primary fibroblasts cultures reveal TDP-43 abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis patients with and without SOD1 mutations. *Neurobiol Aging*, 36, 2005 e5-2005 e13.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger y A. Alvarez-Buylla (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427, 740-4.
- Scheffler, B., N. M. Walton, D. D. Lin, A. K. Goetz, G. Enikolopov, S. N. Roper y D. A. Steindler (2005) Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9353-8.

- Schmidt-Hieber, C., P. Jonas y J. Bischofberger (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429, 184-7.
- Schoenfeld, T. J. y H. A. Cameron (2014) Adult Neurogenesis and Mental Illness. *Neuropsychopharmacology*.
- Schreglmann, S. R., M. Regensburger, E. Rockenstein, E. Masliah, W. Xiang, J. Winkler y B. Winner (2015) The temporal expression pattern of alpha-synuclein modulates olfactory neurogenesis in transgenic mice. *PLoS One*, 10, e0126261.
- Seidenfaden, R., A. Desoeuvre, A. Bosio, I. Virard y H. Cremer (2006) Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol Cell Neurosci*, 32, 187-98.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen y A. Alvarez-Buylla (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21, 7153-60.
- Shan, X., L. Chi, M. Bishop, C. Luo, L. Lien, Z. Zhang y R. Liu (2006) Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells*, 24, 1280-7.
- Sharma, A. K., H. M. Sane, A. A. Paranjape, N. Gokulchandran, A. Nagrajan, M. D'sa y P. B. Badhe (2015) The effect of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation on the survival duration in Amyotrophic Lateral Sclerosis - a retrospective controlled study. *Am J Stem Cells*, 4, 50-65.
- Shen, Q., S. K. Goderie, L. Jin, N. Karanth, Y. Sun, N. Abramova, P. Vincent, K. Pumiglia y S. Temple (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 304, 1338-40.
- Shen, Q., Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S. M. Chuang, S. K. Goderie, B. Roysam y S. Temple (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, 3, 289-300.
- Simpson, J. M., J. Gil-Mohapel, M. A. Pouladi, M. Ghilan, Y. Xie, M. R. Hayden y B. R. Christie (2011) Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*, 41, 249-60.
- Smitt, P. A., D. Troost, E. S. Louwerse, J. M. de Jong, D. T. van Kessel y M. A. de Leeuw (1993) Temporal lobe pathology in amyotrophic lateral sclerosis. Do amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease share a common etiological factor? *Clin Neuropathol*, 12, 88-91.
- Snyder, J. S., N. Kee y J. M. Wojtowicz (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 85, 2423-31.
- Song, H., C. F. Stevens y F. H. Gage (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, 39-44.
- Soo, K. Y., M. Halloran, V. Sundaramoorthy, S. Parakh, R. P. Toth, K. A. Southam, C. A. McLean, P. Lock, A. King, M. A. Farg y J. D. Atkin (2015) Rab1-dependent ER-Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-associated ALS. *Acta Neuropathol*.
- Spassky, N., F. T. Merkle, N. Flames, A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo y A. Alvarez-Buylla (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*, 25, 10-8.

- Steiner, B., F. Klempin, L. Wang, M. Kott, H. Kettenmann y G. Kempermann (2006a) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54, 805-14.
- Steiner, B., S. Wolf y G. Kempermann (2006b) Adult neurogenesis and neurodegenerative disease. *Regen Med*, 1, 15-28.
- Stensaas, L. J. y S. S. Stensaas (1968) Light microscopy of glial cells in turtles and birds. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 91, 315-40.
- Stout, J. C., J. S. Paulsen, S. Queller, A. C. Solomon, K. B. Whitlock, J. C. Campbell, N. Carlozzi, K. Duff, L. J. Beglinger, D. R. Langbehn, S. A. Johnson, K. M. Biglan y E. H. Aylward (2011) Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology*, 25, 1-14.
- Suhonen, J. O., D. A. Peterson, J. Ray y F. H. Gage (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, 383, 624-7.
- Swarup, V. y J. P. Julien (2010) ALS pathogenesis: Recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Takeda, T., T. Uchihara, N. Arai, T. Mizutani y M. Iwata (2009) Progression of hippocampal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis with or without memory impairment: distinction from Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 117, 35-44.
- Takeda, T., T. Uchihara, S. Kawamura y T. Ohashi (2014) Olfactory dysfunction related to TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol*, 33, 65-7.
- Tavazoie, M., L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, M. Louissaint, L. Colonna, B. Zaidi, J. M. Garcia-Verdugo y F. Doetsch (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 279-88.
- Temple, S. y A. Alvarez-Buylla (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 9, 135-41.
- Thompson, A., K. Boekhoorn, A. M. Van Dam y P. J. Lucassen (2008) Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav*, 7 Suppl 1, 28-42.
- Thomsen, G. M., G. Gowing, S. Svendsen y C. N. Svendsen (2014) The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp Neurol*, 262 Pt B, 127-37.
- Tolosa, E., C. Gaig, J. Santamaria y Y. Compta (2009) Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology*, 72, S12-20.
- Tozuka, Y., S. Fukuda, T. Namba, T. Seki y T. Hisatsune (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47, 803-15.
- Turner, M. R. y M. Swash (2015) The expanding syndrome of amyotrophic lateral sclerosis: a clinical and molecular odyssey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86, 667-73.
- Urban, N. y F. Guillemot (2014) Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*, 8, 396.
- Valdmanis, P. N. y G. A. Rouleau (2008) Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 70, 144-52.
- van den Berge, S. A., M. E. van Strien, J. A. Korecka, A. A. Dijkstra, J. A. Sluijs, L. Kooijman, R. Eggers, L. De Filippis, A. L. Vescovi, J. Verhaagen, W. D. van de

- Berg y E. M. Hol (2011) The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain*, 134, 3249-63.
- van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski y F. H. Gage (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13427-31.
- van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer y F. H. Gage (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-4.
- van Tijn, P., W. Kamphuis, M. W. Marlatt, E. M. Hol y P. J. Lucassen (2011) Presenilin mouse and zebrafish models for dementia: focus on neurogenesis. *Prog Neurobiol*, 93, 149-64.
- Vandenbosch, R., L. Borgs, P. Beukelaers, S. Belachew, G. Moonen, L. Nguyen y B. Malgrange (2009) Adult neurogenesis and the diseased brain. *Curr Med Chem*, 16, 652-66.
- Vandeputte, C., V. Reumers, S. A. Aelvoet, I. Thiry, S. De Swaef, C. Van den Haute, J. Pascual-Brazo, T. D. Farr, G. Vande Velde, M. Hoehn, U. Himmelreich, K. Van Laere, Z. Debyser, R. Gijssbers y V. Baekelandt (2014) Bioluminescence imaging of stroke-induced endogenous neural stem cell response. *Neurobiol Dis*, 69, 144-55.
- Walton, N. M., B. M. Sutter, E. D. Laywell, L. H. Levkoff, S. M. Kearns, G. P. Marshall, 2nd, B. Scheffler y D. A. Steindler (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*, 54, 815-25.
- Wang, B., Z. Wang, L. Sun, L. Yang, H. Li, A. L. Cole, J. Rodriguez-Rivera, H. C. Lu y H. Zheng (2014a) The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J Neurosci*, 34, 13314-25.
- Wang, C., T. Chen, G. Li, L. Zhou, S. Sha y L. Chen (2015) Simvastatin prevents beta-amyloid25-35-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through $\alpha 7$ nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology*, 97, 122-32.
- Wang, X., J. Blanchard, I. Grundke-Iqbal, J. Wegiel, H. X. Deng, T. Siddique y K. Iqbal (2014b) Alzheimer disease and amyotrophic lateral sclerosis: an etiopathogenic connection. *Acta Neuropathol*, 127, 243-56.
- Ward, A., L. Jones, C. Nguyen, A. Swenson y D. Tranel (2014) B-62Anosmia as a Biomarker for Personality Change in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Clin Neuropsychol*, 29, 560.
- Warita, H., T. Murakami, Y. Manabe, K. Sato, T. Hayashi, T. Seki y K. Abe (2001) Induction of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in surviving motoneurons of transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Neurosci Lett*, 300, 75-8.
- Warner-Schmidt, J. L. y R. S. Duman (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16, 239-49.
- Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheatley, A. C. Peterson y B. A. Reynolds (1996a) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 16, 7599-609.
- Weiss, S., B. A. Reynolds, A. L. Vescovi, C. Morshead, C. G. Craig y D. van der Kooy (1996b) Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci*, 19, 387-93.

- Winner, B., C. M. Cooper-Kuhn, R. Aigner, J. Winkler y H. G. Kuhn (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 16, 1681-9.
- Winner, B., Z. Kohl y F. H. Gage (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33, 1139-51.
- Winner, B., D. C. Lie, E. Rockenstein, R. Aigner, L. Aigner, E. Masliah, H. G. Kuhn y J. Winkler (2004) Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63, 1155-66.
- Winner, B., M. Regensburger, S. Schreglmann, L. Boyer, I. Prots, E. Rockenstein, M. Mante, C. Zhao, J. Winkler, E. Masliah y F. H. Gage (2012) Role of alpha-synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 32, 16906-16.
- Winner, B., E. Rockenstein, D. C. Lie, R. Aigner, M. Mante, U. Bogdahn, S. Couillard-Despres, E. Masliah y J. Winkler (2008) Mutant alpha-synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiol Aging*, 29, 913-25.
- Winner, B. y J. Winkler (2015) Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a021287.
- Wood, L. K. y S. J. Langford (2014) Motor neuron disease: a chemical perspective. *J Med Chem*, 57, 6316-31.
- Xavier, G. F., F. J. Oliveira-Filho y A. M. Santos (1999) Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, 9, 668-81.
- Yamaguchi, M. y K. Mori (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9697-702.
- Yanez, M., L. Galan, J. Matias-Guiu, A. Vela, A. Guerrero y A. G. Garcia (2011) CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Res*, 1423, 77-86.
- Yoshimi, K., Y. R. Ren, T. Seki, M. Yamada, H. Ooizumi, M. Onodera, Y. Saito, S. Murayama, H. Okano, Y. Mizuno y H. Mochizuki (2005) Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol*, 58, 31-40.
- Yuan, T. F., J. Li, F. Ding y O. Arias-Carrion (2014) Evidence of adult neurogenesis in non-human primates and human. *Cell Tissue Res*, 358, 17-23.
- Zhang, H., F. W. Wang, L. L. Yao y A. J. Hao (2011) Microglia--friend or foe. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 869-83.
- Zhang, K., C. J. Donnelly, A. R. Haeusler, J. C. Grima, J. B. Machamer, P. Steinwald, E. L. Daley, S. J. Miller, K. M. Cunningham, S. Vidensky, S. Gupta, M. A. Thomas, I. Hong, S. L. Chiu, R. L. Haganir, L. W. Ostrow, M. J. Matunis, J. Wang, R. Sattler, T. E. Lloyd y J. D. Rothstein (2015) The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 525, 56-61.
- Zhang, R. L., M. Chopp, C. Roberts, X. Liu, M. Wei, S. P. Nejad-Davarani, X. Wang y Z. G. Zhang (2014) Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse. *PLoS One*, 9, e113972.

- Zhao, B., M. Zhong y K. Jin (2008) Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva Med*, 50, 55-64.
- Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers, Jr., G. L. Ming y F. H. Gage (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 26, 3-11.
- Zhao, M., S. Momma, K. Delfani, M. Carlen, R. M. Cassidy, C. B. Johansson, H. Brismar, O. Shupliakov, J. Frisen y A. M. Janson (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7925-30.
- Zhou, H., C. Huang, H. Chen, D. Wang, C. P. Landel, P. Y. Xia, R. Bowser, Y. J. Liu y X. G. Xia (2010) Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet*, 6, e1000887.
- Ziabreva, I., E. Perry, R. Perry, S. L. Minger, A. Ekonomou, S. Przyborski y C. Ballard (2006) Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res*, 61, 311-6.

XII. ANEXOS

XII. a. Material suplementario

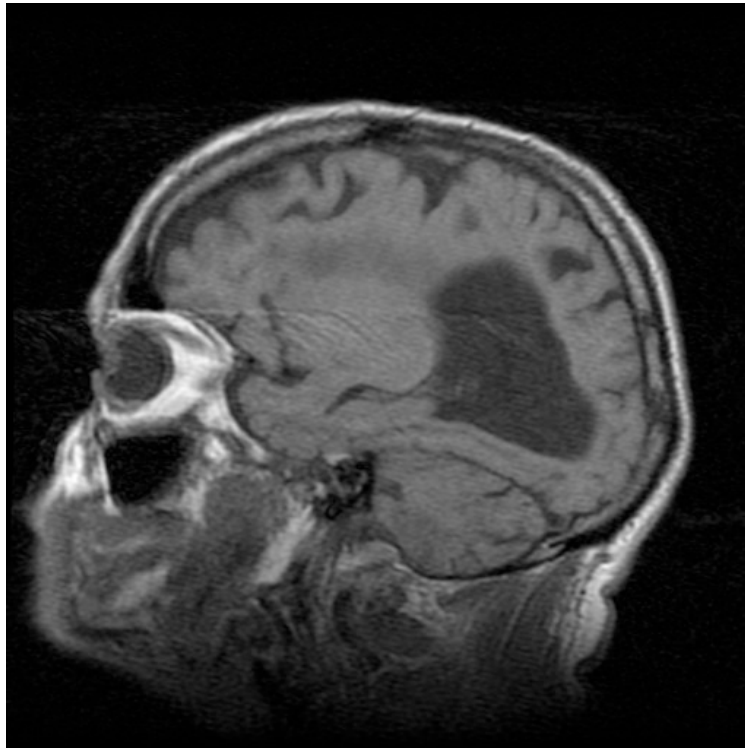


Imagen 24: RM del paciente 2. Imagen de Resonancia Magnetica potenciada en T1 corte sagital perteneciente al paciente 2 (ELA con DFT) en la que se aprecia importante atrofia frontal y temporal



Imagen 2: Imagen de Resonancia Magnetica potenciada en T1 perteneciente al paciente 2 (ELA con DFT) corte sagital en la que se aprecia la importante atrofia de predominio frontal y temporal I

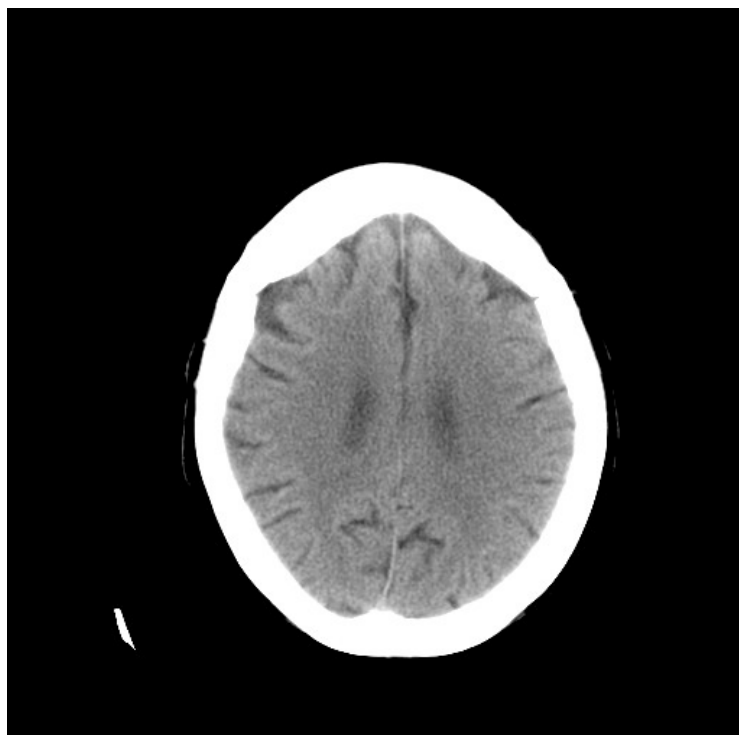


Imagen 26: TAC de la paciente 7. Imagen de tomografía axial computerizada perteneciente a la paciente 7 (sin deterioro cognitivo asociado) en la que se observa una discreta atrofia frontal

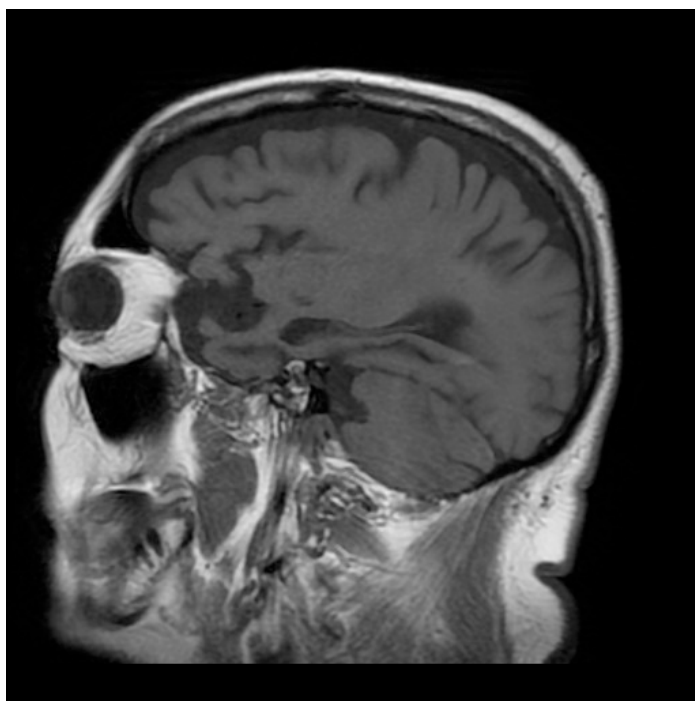


Imagen 27: RM del paciente 8. Imagen de Resonancia Magnética encefálica ponderada en T1 perteneciente al paciente 8 en la que se observa atrofia frontal y temporal. El paciente no presentaba síntomas de deterioro cognitivo.

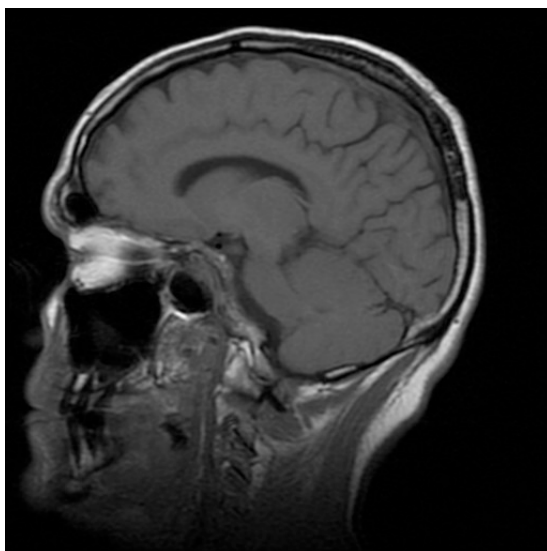


Imagen 28: RM del paciente 5: Imagen de Resonancia magnética encefálica ponderada en T1 corte transversal, perteneciente al paciente 5, no se observa atrofia significativa.

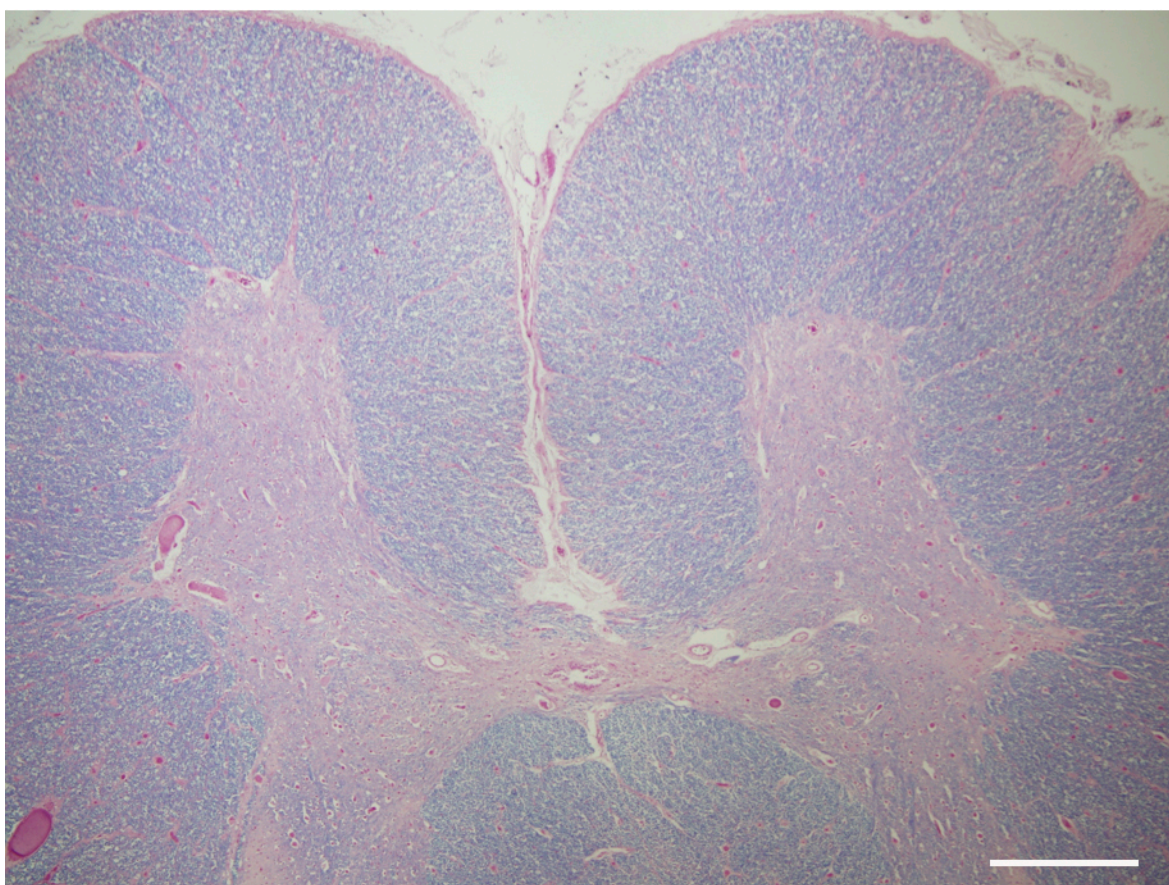


Imagen 29: Sección medular en la necropsia. Tinción con HE con de una sección que incluye la médula dorsal en ella se observa el importante adelgazamiento con pérdida de neuronas motoras en el asta anterior. La barra corresponde a 400 μ m.

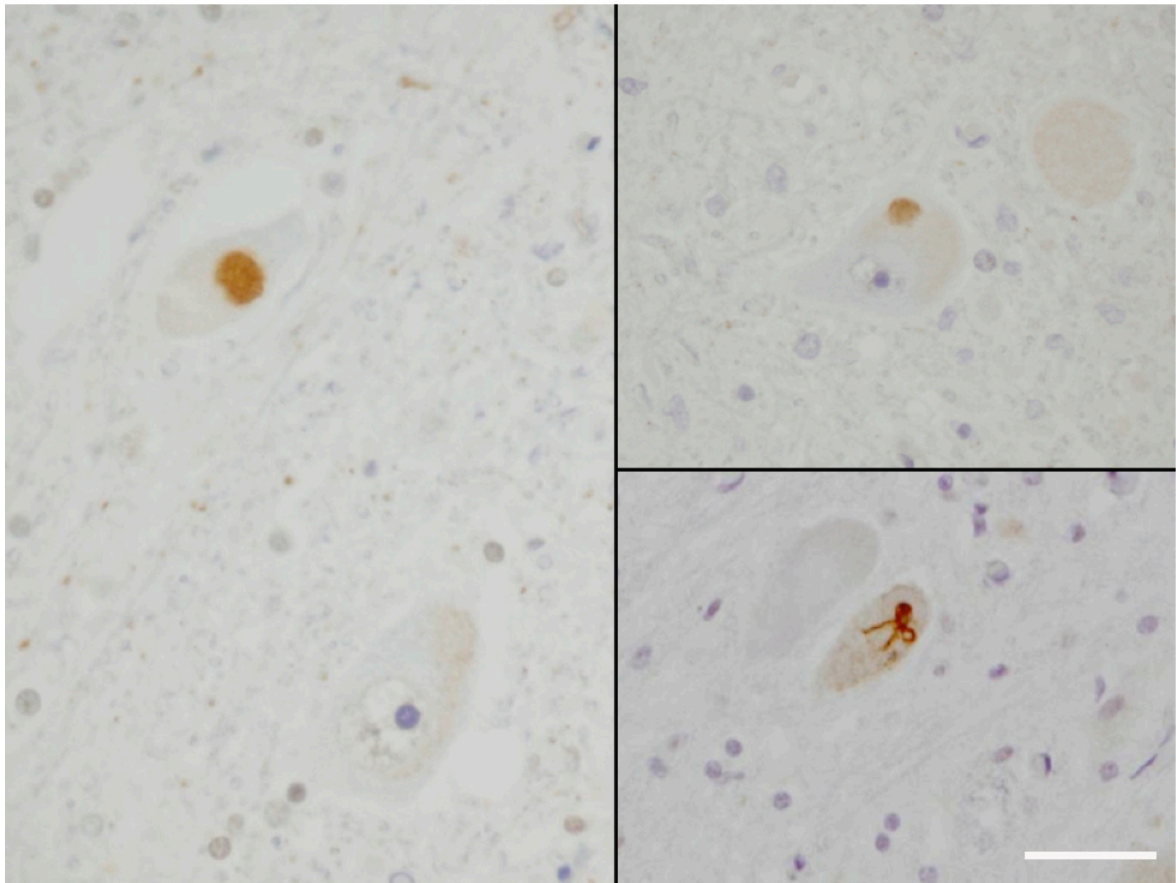


Imagen 30: Inclusiones ubiquitinadas en pacientes con ELA. Inclusiones ubiquitinadas en el citoplasma de las neuronas motoras observadas con inmunohistoquímica directa. La barra corresponde a 25 μm .

Tabla 9: Inmunohistoquímica para el diagnóstico de ELA. El valor expresado para TDP-43 y ubiquitina son inclusiones por campo, para %pTDP-43 es porcentaje de inclusiones fosforiladas de TDP-43 con respecto al total.

	TDP-43	%pTDP-43 citoplasmática	Ubiquitina
Paciente 1 (ELA-DFT)	15	33,34	9
Paciente 2 (ELA-DFT)	19	30,21	8
Paciente 3	12	20,15	6
Paciente 4	13	11,8	9
Paciente 5	14	6,5	9
Paciente 6	17	29,3	4
Paciente 7	16	25	5
Paciente 8	7	7,31	7
Paciente 9	13,4	10,87	12
CONTROL 1	14	2	1
CONTROL 2	11	0	0
CONTROL 3	8	1,61	1
CONTROL 4	14	2,67	0

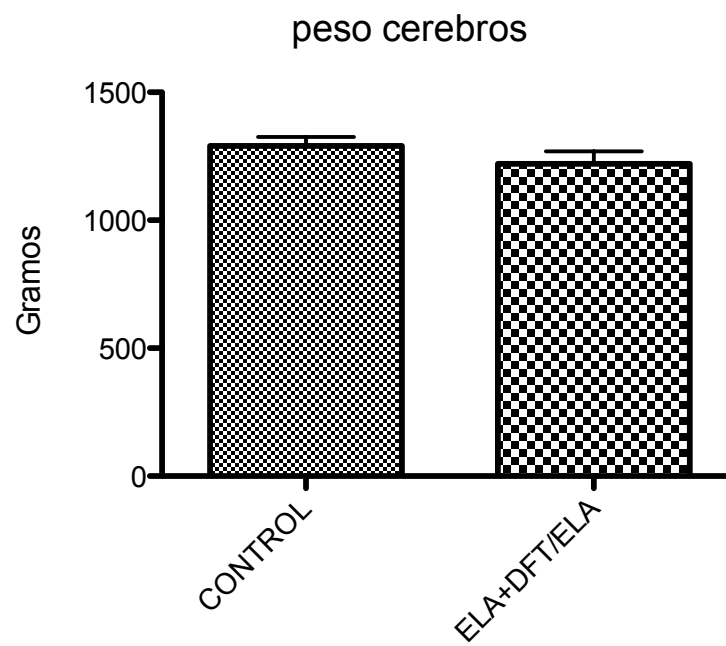


Gráfico 51: Peso de los cerebros en controles y pacientes No existen diferencias significativas en el peso de los cerebros.

Tabla 10: Descripción de los hallazgos de la neurogénesis en la SVZ paciente a paciente

Neurogénesis SVZ									
ID PACIENTES	CAMBIOS MORFOLOGICOS EN SVZ		CAMBIOS EN MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS EN SVZ						
	CAPA GAP (μm^2)	CAPA Ribbon (μm^2)	PROLIFERACION CELULAR			NPCs	Astrocitos	Neurogénesis / Neuroblastos	
			PCNA	KI67	PHOS- H3	GFAP δ	GFAP	PSA-NCAM	DCX
Paciente 1 (ELA +DFT)	87 \pm 1 9	111 \pm 22	67 \pm 7	83 \pm 11	8 \pm 1	52 \pm 3	149 \pm 29	29 \pm 3	21
PACIENTE 2 ELA-DFT	67 \pm 6	70 \pm 9	69 \pm 4	77 \pm 5	7 \pm 2	58 \pm 8	122 \pm 9	24 \pm 2	25
PACIENTE 3	63 \pm 7	79 \pm 12	71 \pm 6	39 \pm 3	5 \pm 1	28 \pm 8	132 \pm 9	21 \pm 9	12
PACIENTE 4	69 \pm 6	121 \pm 21	67 \pm 2	32 \pm 7	8 \pm 1	29 \pm 7	123 \pm 10	22 \pm 3	23
PACIENTE 5	72 \pm 6	86 \pm 12	69 \pm 6	41 \pm 8	1 \pm 1	31 \pm 2	121 \pm 9	18 \pm 4	19
PACIENTE 6	64 \pm 7	78 \pm 7	61 \pm 6	32 \pm 4	1 \pm 1	20 \pm 3	107 \pm 13	17 \pm 3	26
PACIENTE 7	79 \pm 8	83 \pm 2	80 \pm 1	30 \pm 6	9 \pm 1	29 \pm 7	103 \pm 13	27 \pm 1	25
PACIENTE 8	81 \pm 6	82 \pm 7	66 \pm 9	37 \pm 4	1 \pm 1	24 \pm 13	98 \pm 12	26 \pm 1	22
PACIENTE 9	67 \pm 9	81 \pm 7	72 \pm 4	47 \pm 3	1 \pm 1	27 \pm 4	88 \pm 11	22 \pm 3	19
CONTROL 1	51 \pm 9	59 \pm 10	28 \pm 7	16 \pm 8	4 \pm 2	9 \pm 3	102 \pm 12	14 \pm 3	2
CONTROL 2	47 \pm 3	61 \pm 7	21 \pm 1	13 \pm 7	5 \pm 1	11 \pm 2	89 \pm 11	19 \pm 1	6
CONTROL 3	48 \pm 7	57 \pm 9	26 \pm 5	17 \pm 6	6 \pm 2	14 \pm 1	81 \pm 13	16 \pm 2	6
CONTROL4	33 \pm 3	47 \pm 3	22 \pm 1	13 \pm 5	3 \pm 1	9 \pm 3	76 \pm 11	9 \pm 3	7

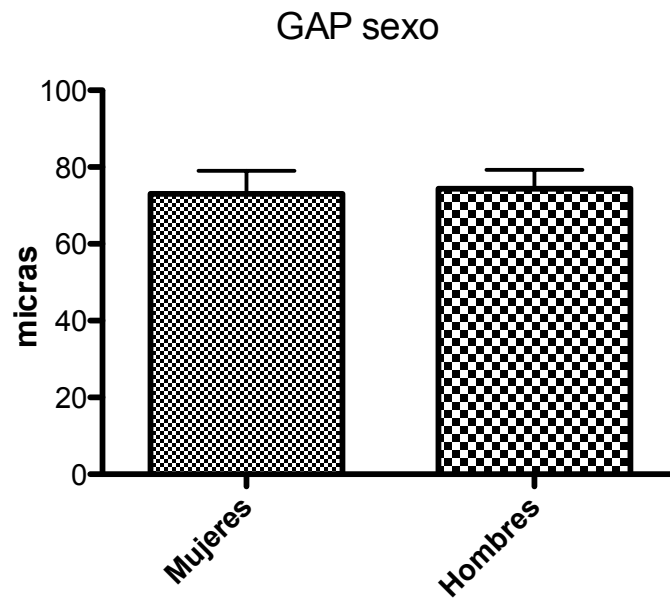


Gráfico 52: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a su sexo. No se observan diferencias significativas en el tamaño de la capa GAP entre los pacientes con ELA según su sexo.

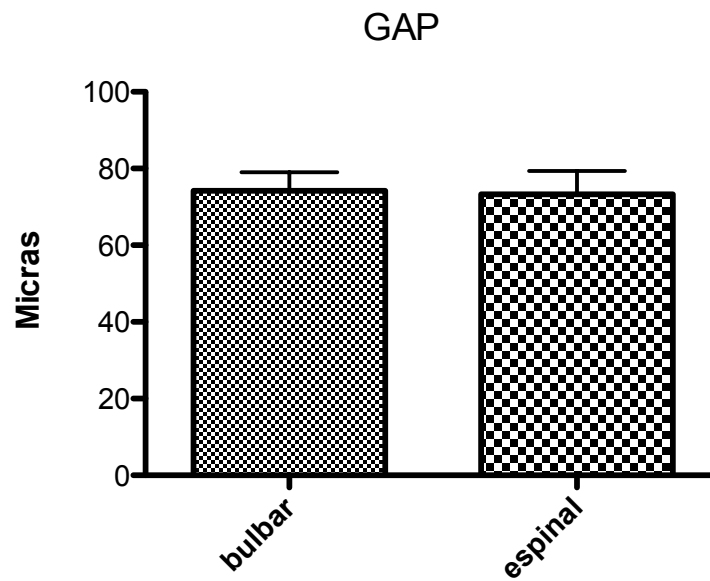


Gráfico 53: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a la forma de inicio. No se observan diferencias del tamaño de la capa GAP según los pacientes tengan una forma de inicio bulbar o espinal.

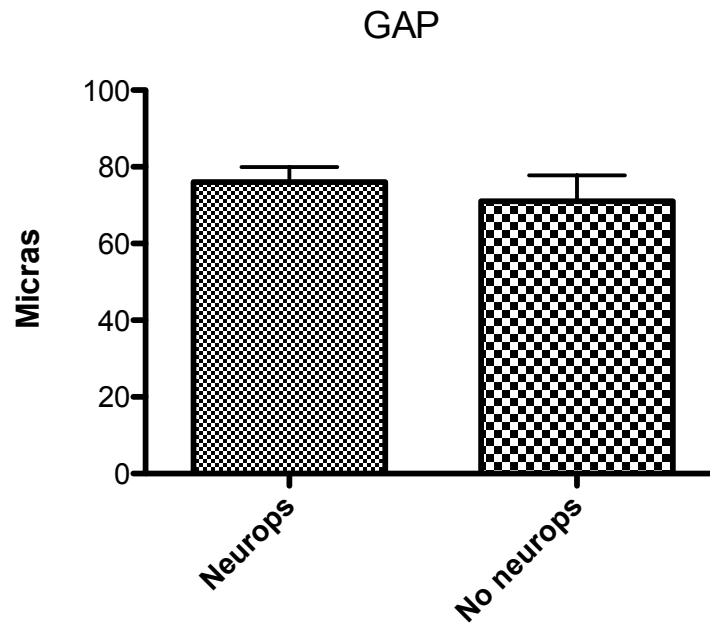


Gráfico 54: Tamaño de la capa GAP en pacientes con respecto a la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos. No se observan diferencias significativas del tamaño de la capa GAP (hipocelular) cuando se analizan los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.



Gráfico 55: Tamaño de la capa astrocitaria *ribbon* en pacientes con respecto a su sexo. No se observan diferencia en el tamaño de la capa Ribbon (astrocitaria) según el sexo de los pacientes con ELA.

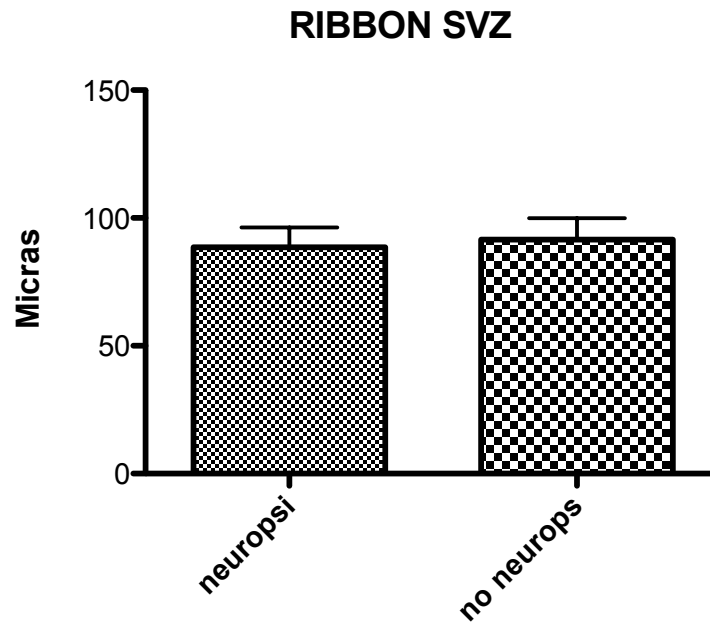


Gráfico 56: Tamaño de la capa *ribbon* con respecto a la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas. No existen diferencias significativas entre el tamaño de la capa *ribbon* (astrocitaria) entre los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.

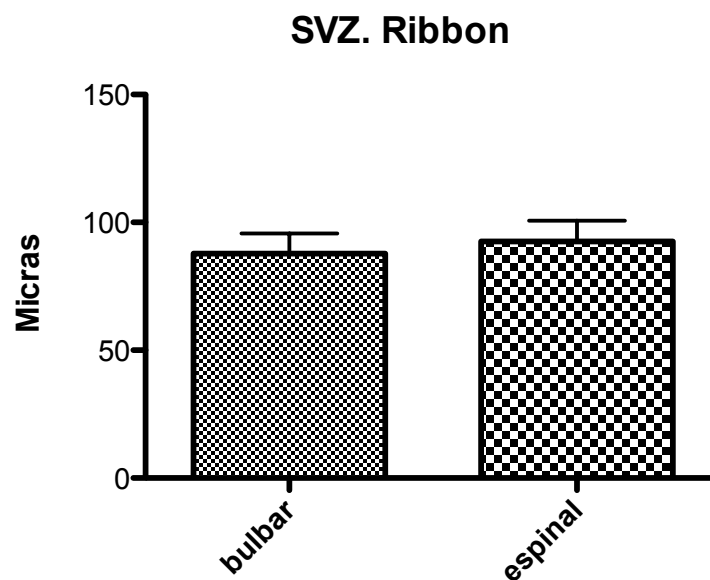


Gráfico 57: Tamaño de la capa *ribbon* de los pacientes con respecto a la forma de inicio. No existen diferencias significativas en el tamaño de la capa *ribbon* (astrocitaria) entre los pacientes con formas de inicio bulbar y espinal.

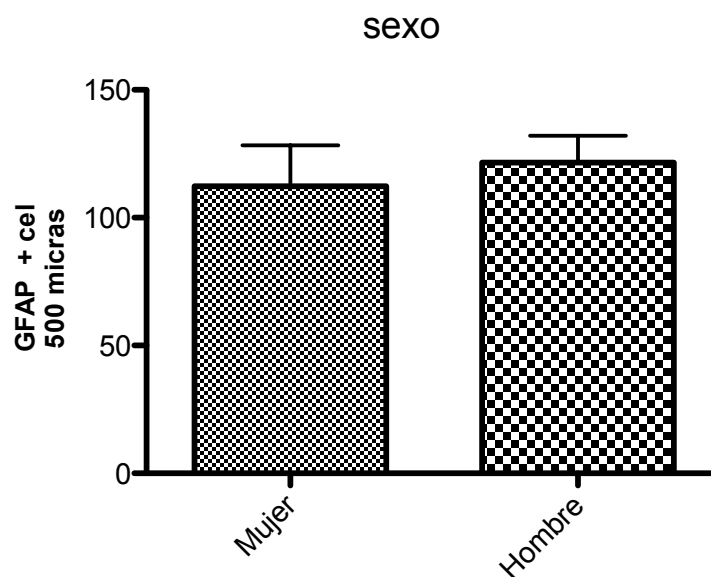


Gráfico 58: Número de células madre neurales progenitoras proliferativas tipo B de los pacientes marcadas con GFAP según su sexo. Comparación del número de células madre tipo B en la SVZ de pacientes con ELA conforme a su sexo. No existen diferencias significativas

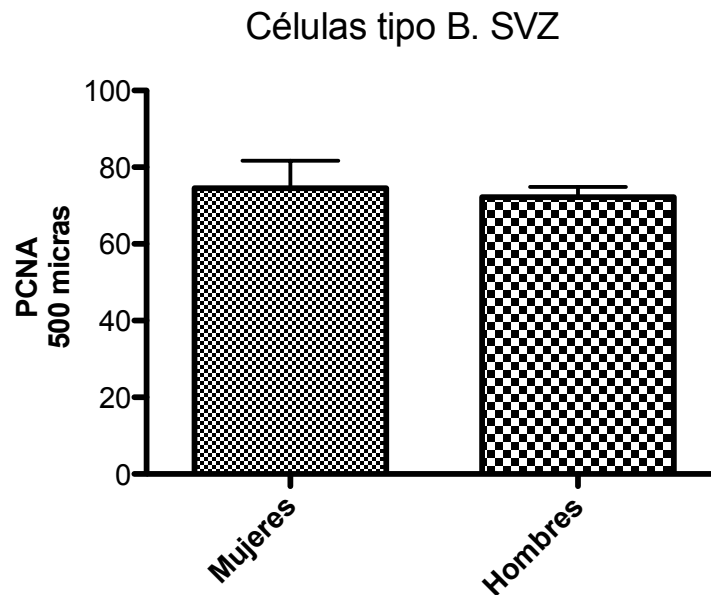


Gráfico 59: Número de células madre progenitoras tipo B marcadas con PCNA según el sexo de los pacientes. No se observan diferencias en el número de células marcadas con PCNA (células neurales progenitoras proliferativas) según el sexo de los pacientes.

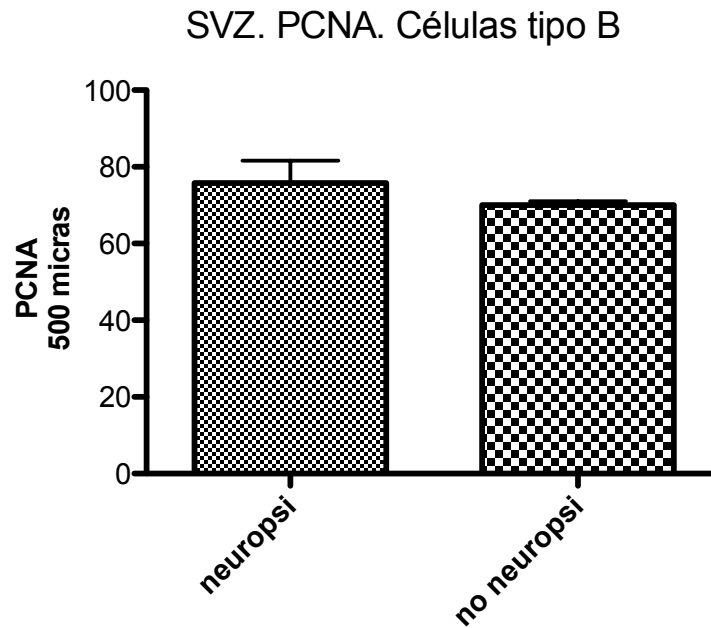


Gráfico 60: Número de células madre neurales progenitoras tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de los pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos. No se observan diferencias en el número de células neurales progenitoras proliferativas marcadas con PCNA entre los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos.

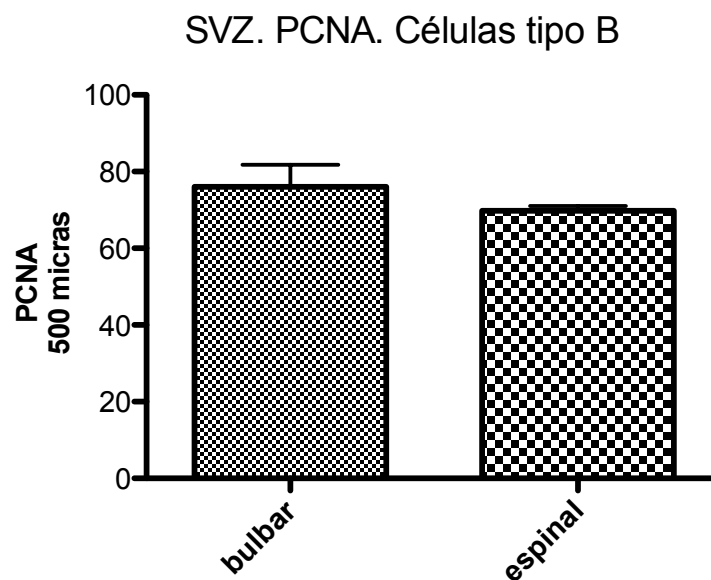


Gráfico 61: Número de células madre neurales progenitoras tipo B marcadas con PCNA en la SVZ de los pacientes según su forma de inicio. No se observan diferencias en el número de células neurales progenitoras proliferativas marcadas con PCNA entre los pacientes según su forma de inicio bulbar o espinal.

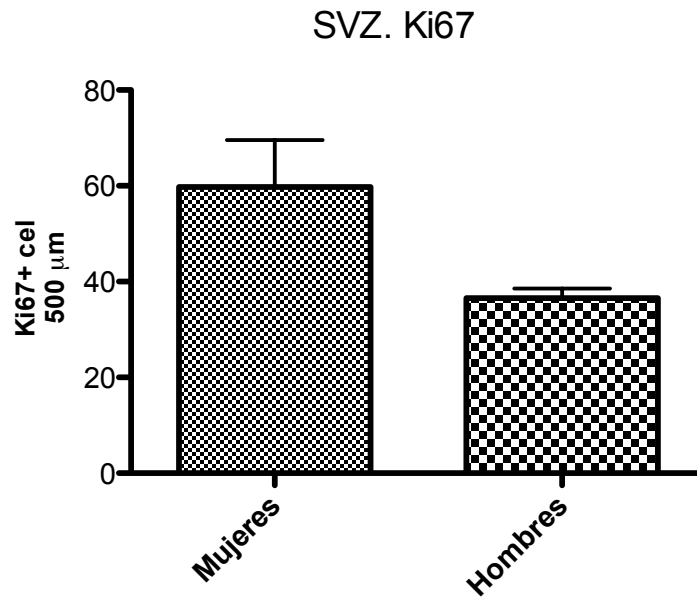


Gráfico 62: Número de células madre progenitoras tipo B marcadas con Ki67 en la SVZ de los pacientes según su sexo. No se observan diferencias en el número de células neurales progenitoras proliferativas tipo B marcadas con Ki67 entre los pacientes según sexo.

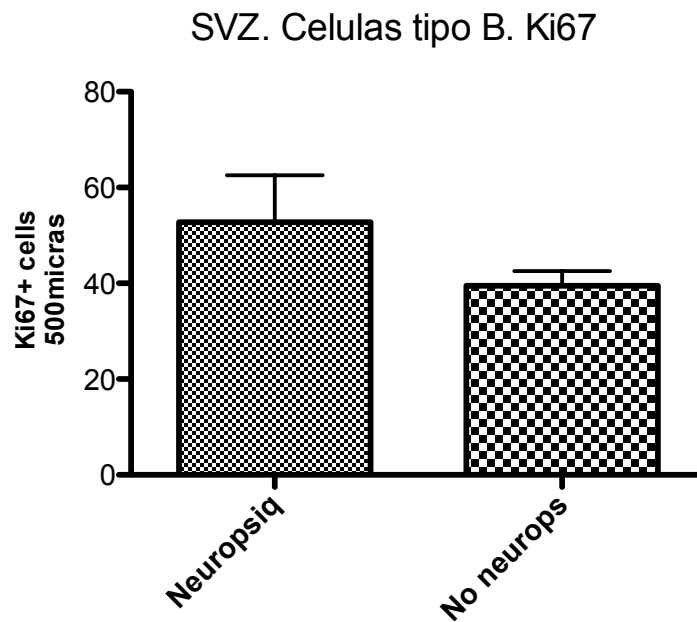


Gráfico 63: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con Ki67 de los pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos. No existen diferencias significativas entre el número de células madres neurales progenitoras proliferativas tipo B en la SVZ marcadas con Ki-67 entre los pacientes con o sin síntomas neuropsiquiátricos.

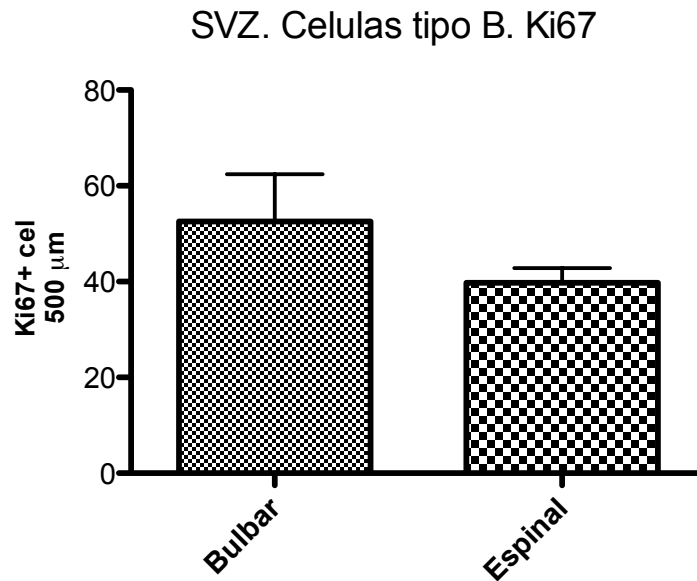


Gráfico 64: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con Ki67 en la SVZ de los pacientes según la forma de inicio. No existen diferencias significativas en el número de células neurales progenitoras proliferativas marcadas con Ki67 entre los pacientes con formas de inicio bulbar y espinal.

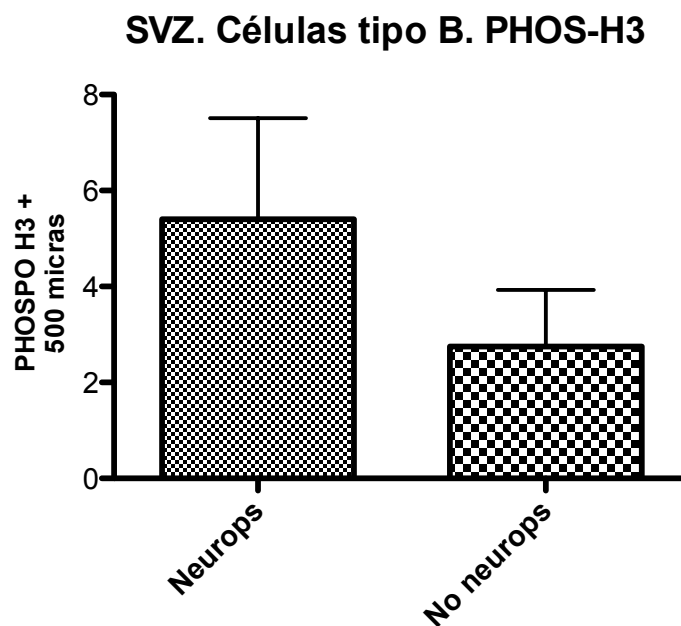


Gráfico 65: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos. No existen diferencias significativas entre las células neurales progenitoras proliferativas, células tipo B marcadas con fosfohistona 3 en los pacientes con y sin síntomas neuropsiquiátricos.

SVZ. Células tipo B. PHOS-H3

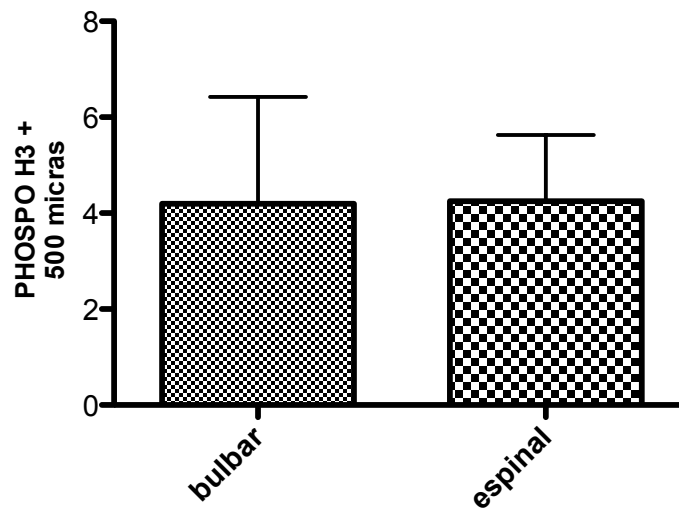


Gráfico 66: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de pacientes según la forma de inicio de la enfermedad. No existen diferencias significativas en el número de células neurales progenitoras proliferativas, células tipo B, entre los pacientes con formas de inicio bulbar o espinal.

SVZ. Células tipo B. PHOS-H3

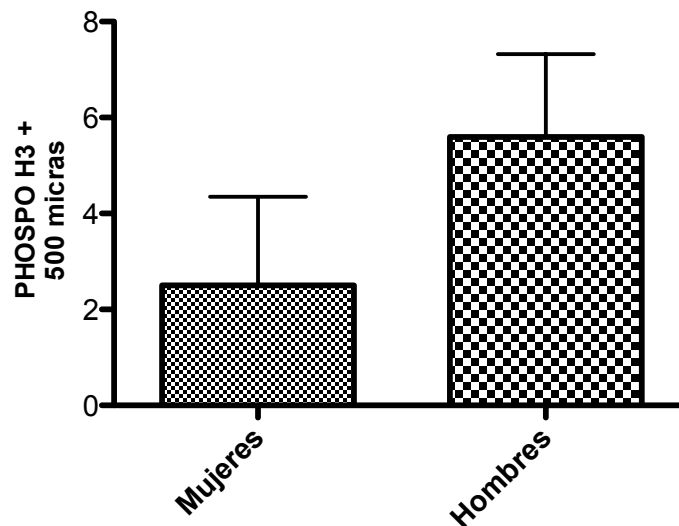


Gráfico 67: Número de células madre neurales progenitoras, tipo B, marcadas con fosfohistona 3 en la SVZ de los pacientes según su sexo. No existen diferencias significativas en el número de células neurales progenitoras proliferativas, células tipo B, marcadas con fosfohistona 3 entre los pacientes con ELA según su sexo.

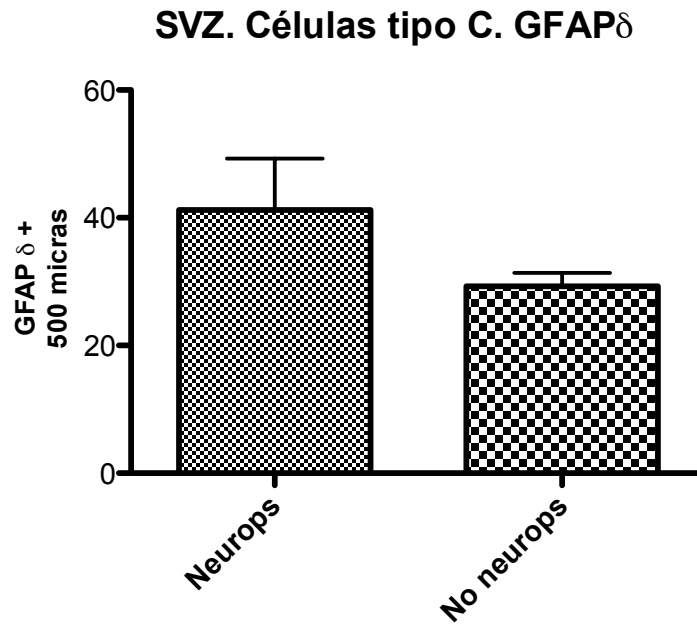


Gráfico 68: Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas. No se observan diferencias significativas en el número de células tipo C, marcadas con GFAP δ , según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas.

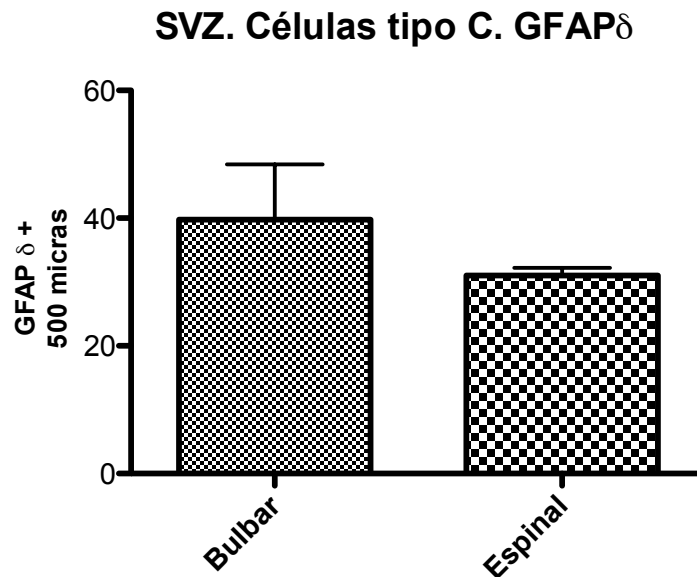


Gráfico 69: Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según la forma de inicio de la enfermedad. No se observan diferencias significativas en el número de células neurales pluripotenciales, tipo C, marcadas con GFAP δ , según la forma de inicio bulbar o espinal.

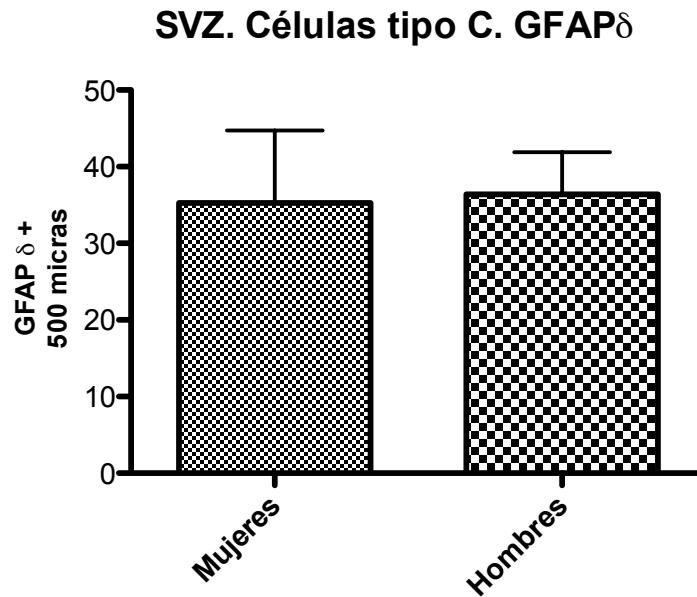


Gráfico 70 : Número de células NPCs tipo C marcadas con GFAP δ en la SVZ de pacientes según sexo. No existen diferencias significativas entre el número de células neurales pluripotenciales, células tipo C marcadas con GFAP δ entre hombres y mujeres.

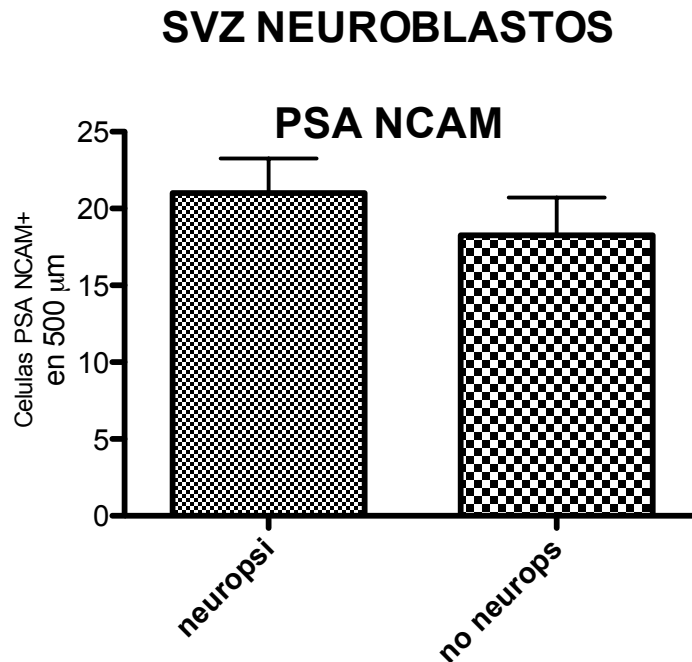


Gráfico 71: Número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de los pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas. Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes sin y con síntomas neuropsiquiátricos. No se observan diferencias significativas.

SVZ NEUROBLASTOS

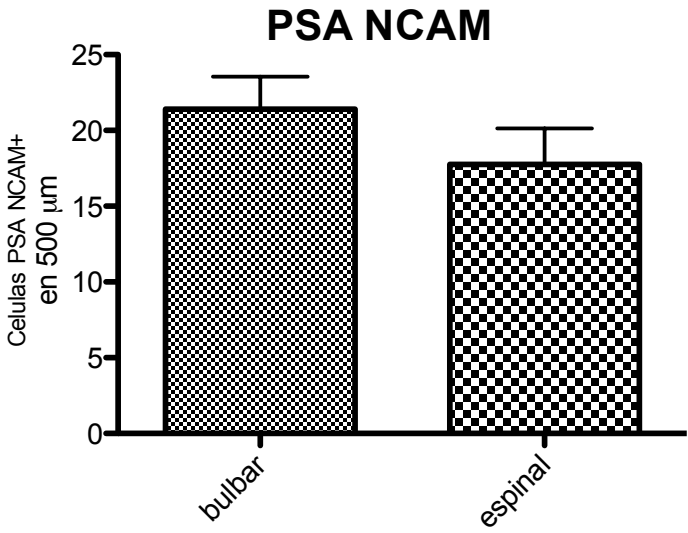


Gráfico 72: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes con forma de inicio bulbar y espinal. No se observan diferencias significativas.

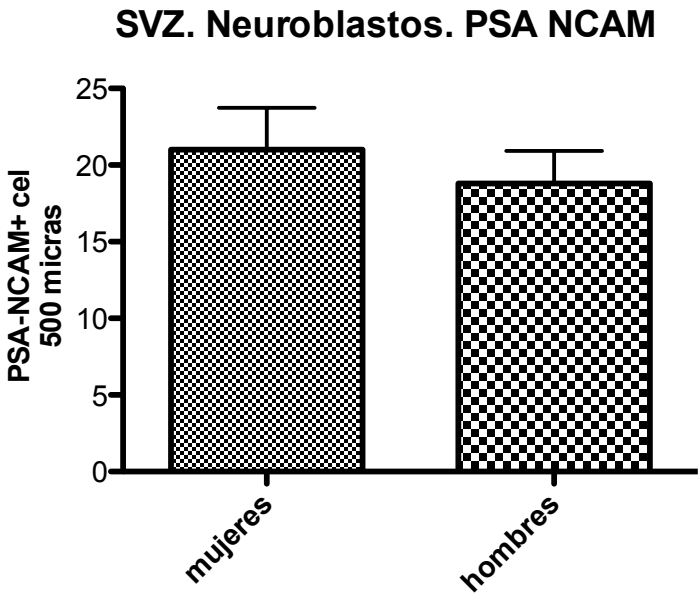


Gráfico 73: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con PSA NCAM) en la SVZ en los pacientes según sexo. No existen diferencias significativas entre el número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SVZ de los pacientes según su sexo.

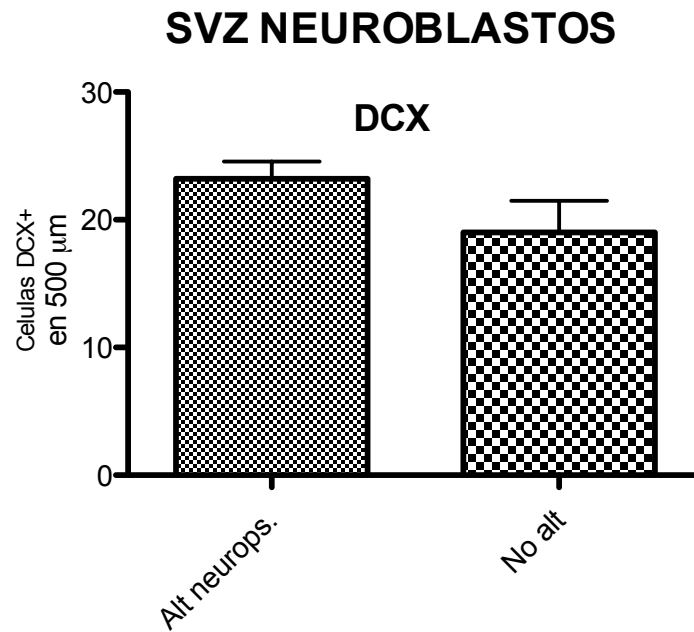


Gráfico 74: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas. No existen diferencias en el número de neuroblastos marcados con DCX entre los pacientes con y sin alteraciones psiquiátricas.

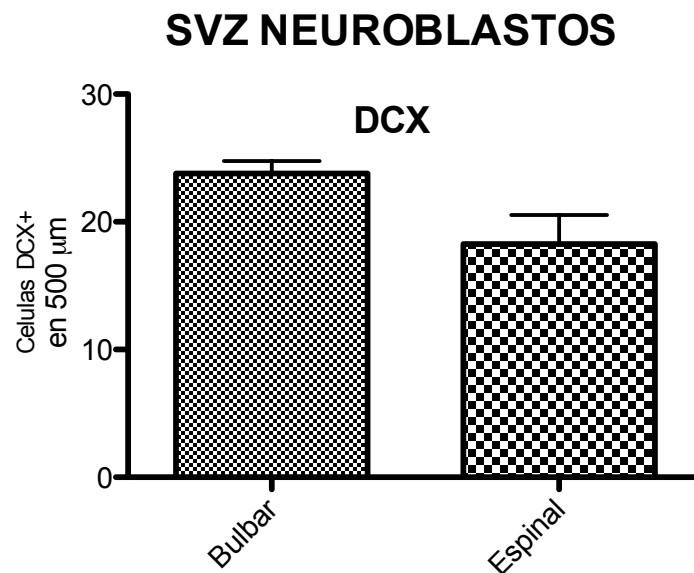


Gráfico 75: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según su forma de inicio. No existen diferencias significativas en el número de neuroblastos marcados con doblecortina entre los pacientes de inicio bulbar y espinal.

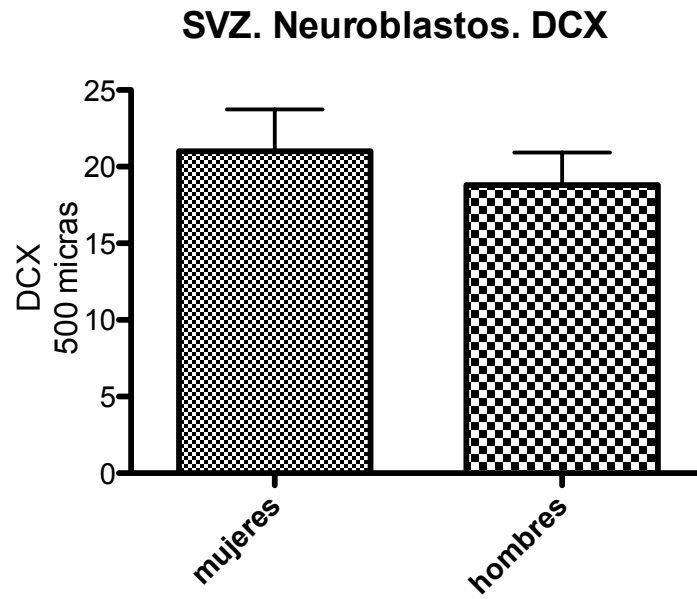


Gráfico 76: Estudio de la cantidad de neuroblastos (marcados con DCX) en la SVZ en los pacientes según sexo. No existen diferencias en el número de neuroblastos (células tipo A) marcadas con doblecortina entre la SVZ de los pacientes según su sexo.

Tabla 11: Hallazgos de la neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo paciente a paciente

CONCENTRADO DE RESULTADOS								
ID PACIENTES	CAMBIOS EN MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS EN HIPOCAMPO							
		PROLIFERACION CELULAR		NPCs	ASTROCITOS	Neurogénesis / NEUROBLASTOS		MACROFAGOS/ MORFOLOGIA
	PCNA	KI67	PHOS-H3	GFAP δ	GFAP	PSA-NCAM	DCX	IBA-1
1 DFT - ELA	1	0	0	2,15	154	0	+	18 AMEBOIDE
2 DFT - ELA	0	0	0	1	139	0	+	16 AMEBOIDE
3 ELA	2	0	0	0	153	0	+	19 AMEBOIDE
4- ELA	1	1	0,3	2	89	0	+	18 AMEBOIDE
5-ELA	1	1	0,7	4	110	0	+	25 AMEBOIDE
6-ELA	0	0,5	0,5	1	121	1	+	15 AMEBOIDE
7-ELA	0,5	0,6	0	6	85	2	+	17 AMEBOIDE
8-ELA	1	2	0,6	2	89	2,1	+	18 AMEBOIDE
9-ELA	2	0,2	0,5	3	96	1	+	17 AMEBOIDE
Control 1	3	3	3	8	33	19	++	27 RAMIFICADAS
Control 2	3	4	3	12	25	11	++	33 RAMIFICADAS
Control 3	6	4	2	15	33	18	+	25 RAMIFICADAS
Control 4	4	4	2	9	37	10	+	38 RAMIFICADAS

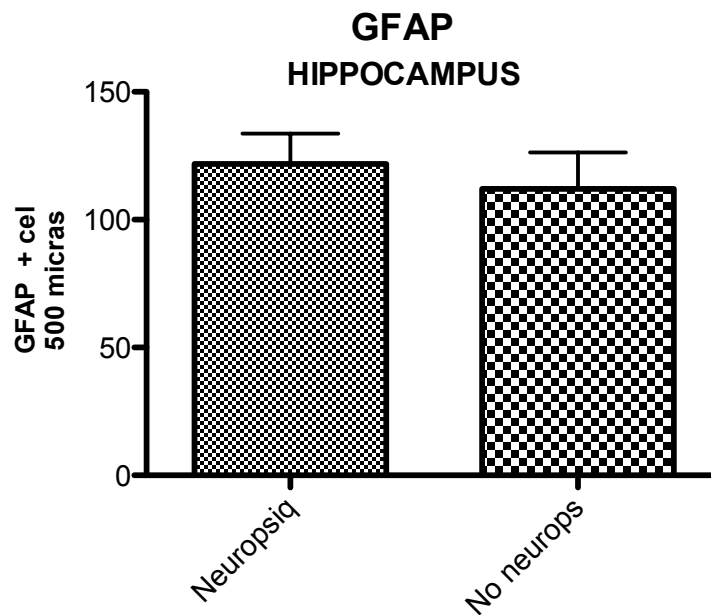


Gráfico 77: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de manifestaciones neuropsiquiátricas. No existen diferencias significativas en el número de astrocitos marcados con GFAP entre los pacientes con ELA con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.

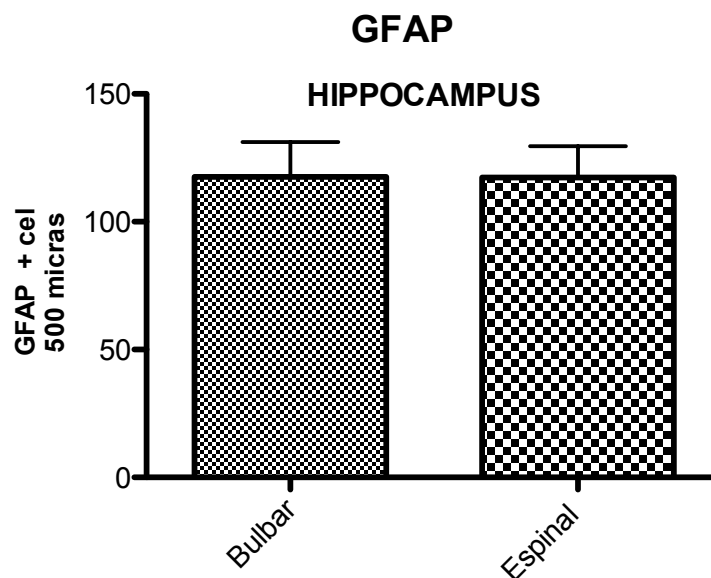


Gráfico 78: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según la forma de inicio. No se observan modificaciones en el grado de astrocitosis (estudiado con la GFAP) del giro dentado entre los pacientes de inicio bulbar y espinal.

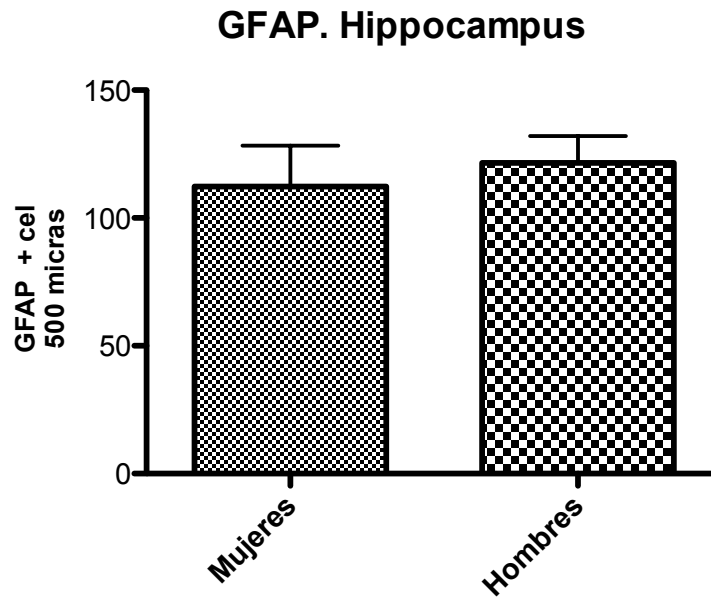


Gráfico 79: Número de células marcadas con GFAP en la SGZ de pacientes según el sexo. No se observan diferencias significativas entre el número de células gliales marcadas con GFAP en el giro dentado de los pacientes según su sexo.

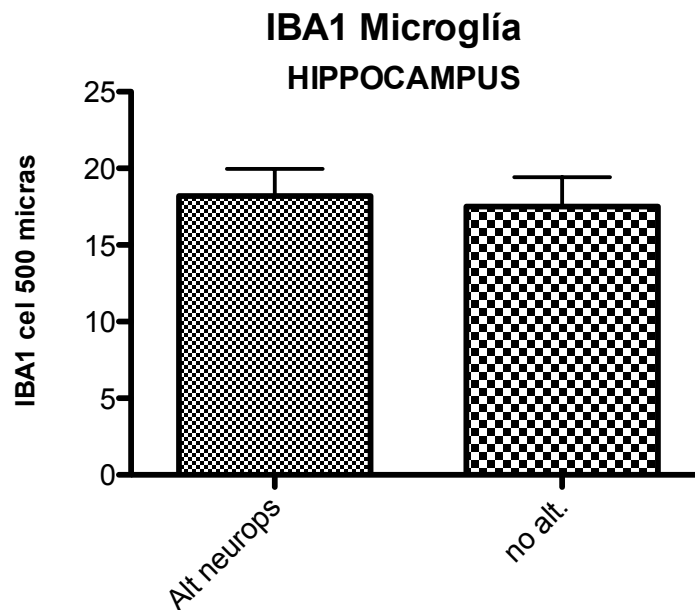


Gráfico 80: Cantidad de microglía marcada con IBA1 en la SGZ de los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas. No existen diferencias significativas en la cantidad de microglía marcada con IBA1 entre los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.

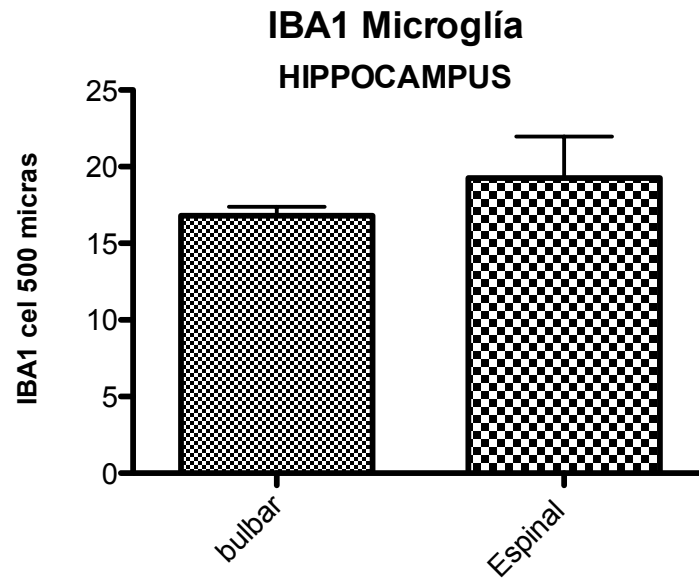


Gráfico 81: Cantidad de microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes según la forma de inicio. No existen diferencias significativas en el número de células marcadas con IBA1 (microglía) entre los pacientes con forma de inicio bulbar y espinal.

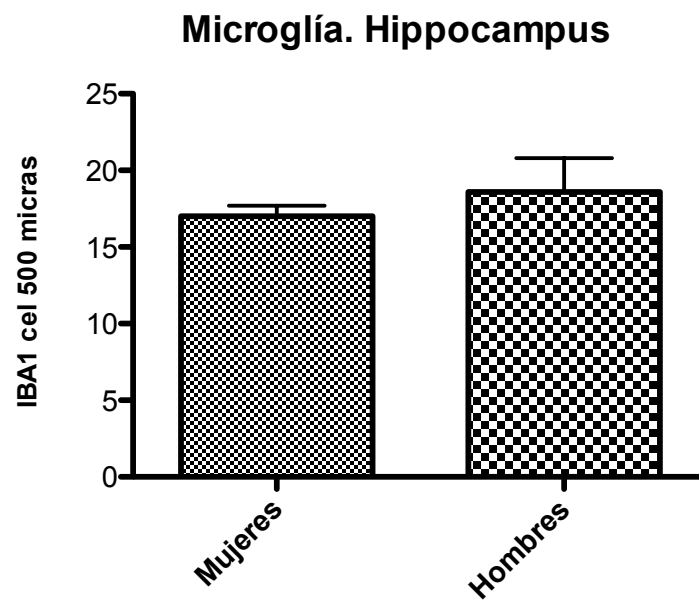


Gráfico 82: Cantidad de microglía marcada con IBA-1 en la SGZ de pacientes según el sexo. No existen diferencias significativas en el número de células de microglía marcadas con IBA-1 en el giro dentado de los pacientes según su sexo.

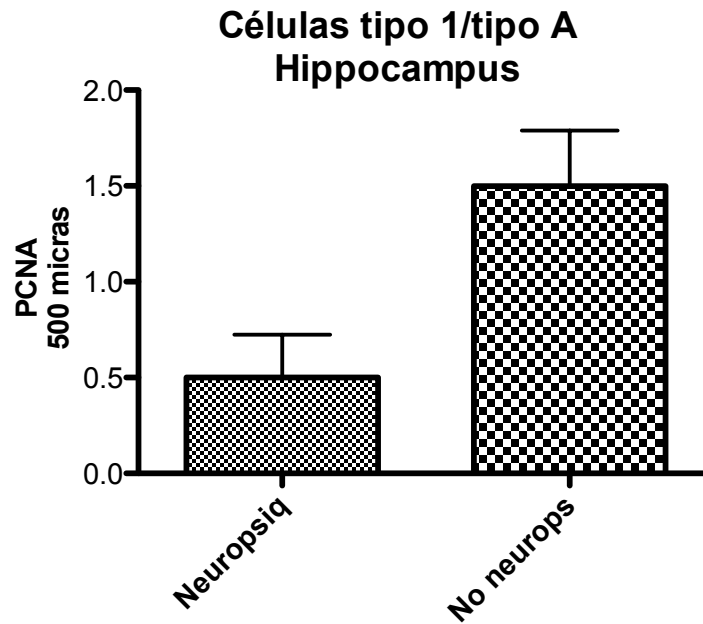


Gráfico 83: Cantidad de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con PCNA en la SGZ de pacientes según la presencia o ausencia de síntomas neuropsiquiátricos. No se aprecian diferencias significativas en el número de células marcadas con PCNA entre los pacientes con o sin manifestaciones neuropsiquiátricas.

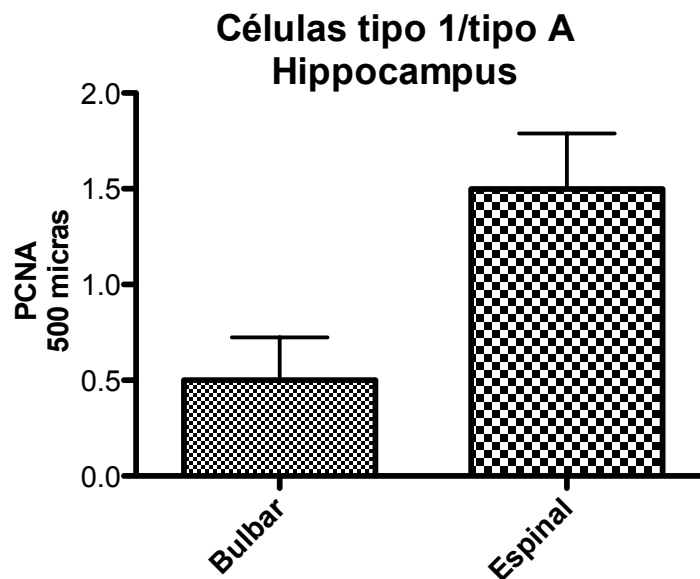


Gráfico 84: Número de células neurales progenitoras tipo 1/tipo A marcadas con PCNA según la forma de inicio. No existen diferencias significativas entre el número de células madre marcadas con PCNA en la SGZ de los pacientes de ELA de inicio bulbar frente a los de inicio espinal.

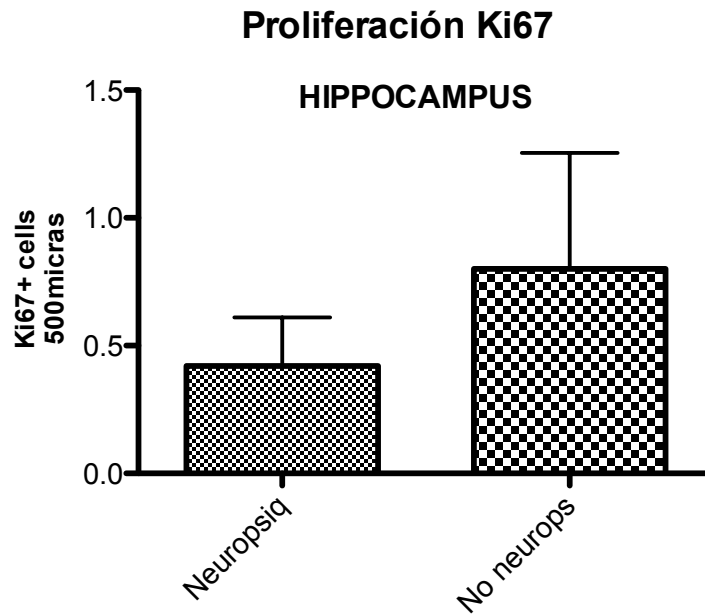


Gráfico 85: Número de células madre neurales tipo 1 /tipo A marcadas con Ki67 según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas. No se observan diferencias significativas entre los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas cuando se marcan las células pluripotenciales (1) con el marcador Ki67.

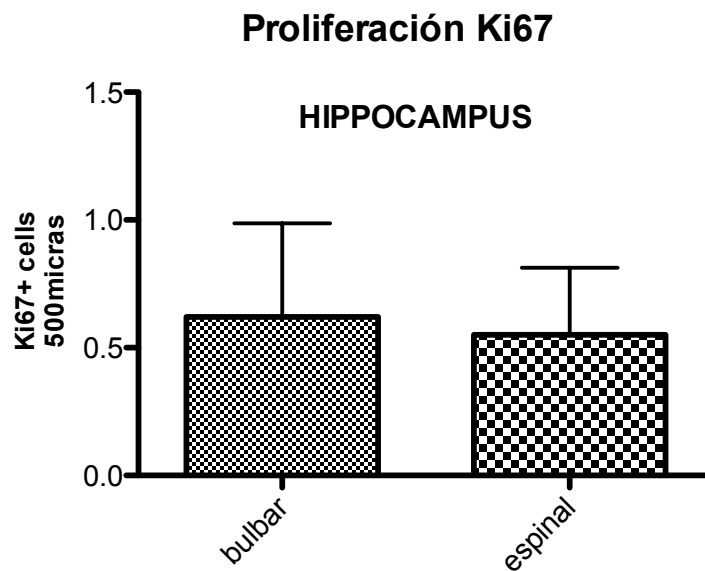


Gráfico 86: Número de células madre neurales tipo 1 /tipo A marcadas con Ki67 según la forma de inicio. No se observan diferencias significativas con respecto a la proliferación de las células pluripotenciales (1) marcadas con Ki67 cuando se comparaban los pacientes según su forma de inicio.

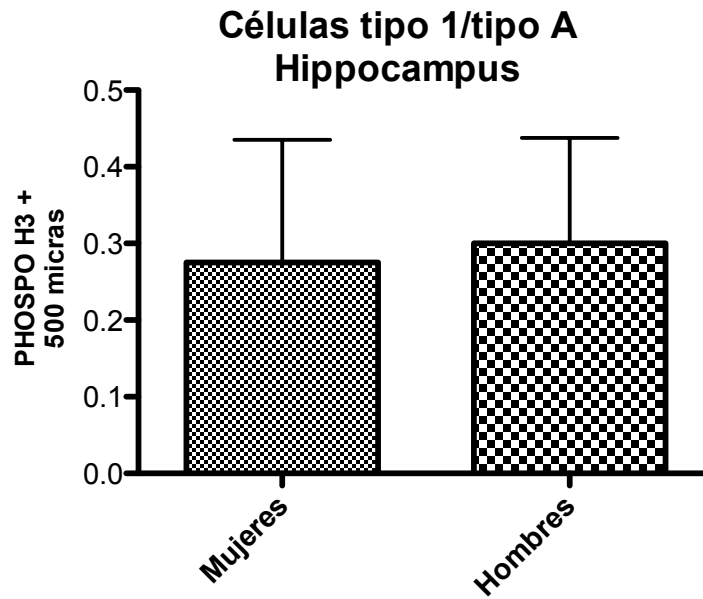


Gráfico 87: Número de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona 3 en la zona subgranular de los pacientes según el sexo. No existen diferencias significativas entre el número de células tipo 1 marcadas con KI67 de los pacientes según su sexo.

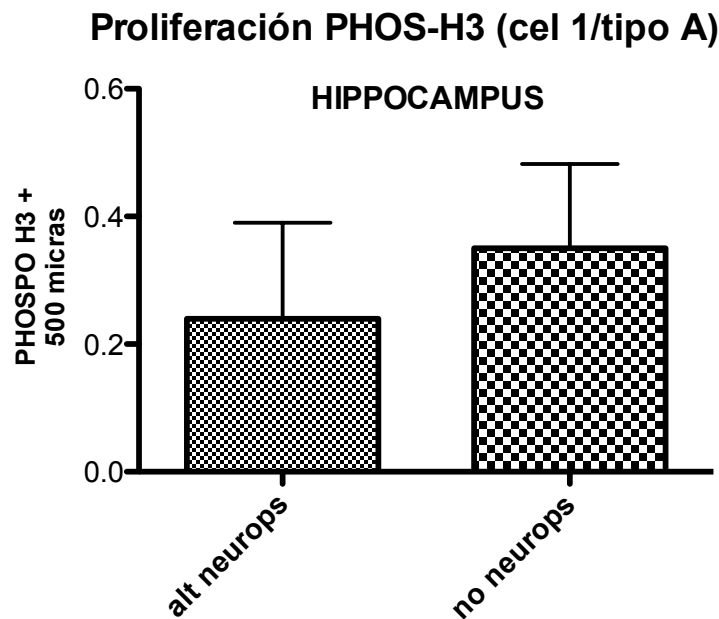


Gráfico 88: Número de células madre neurales progenitoras (tipo 1/tipo A) marcadas con fosfohistona 3 en la zona subgranular de los pacientes según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas. No se encontraron diferencias significativas en la proliferación de las células pluripotenciales entre los pacientes que presentaban o no alteraciones neuropsiquiátricas.

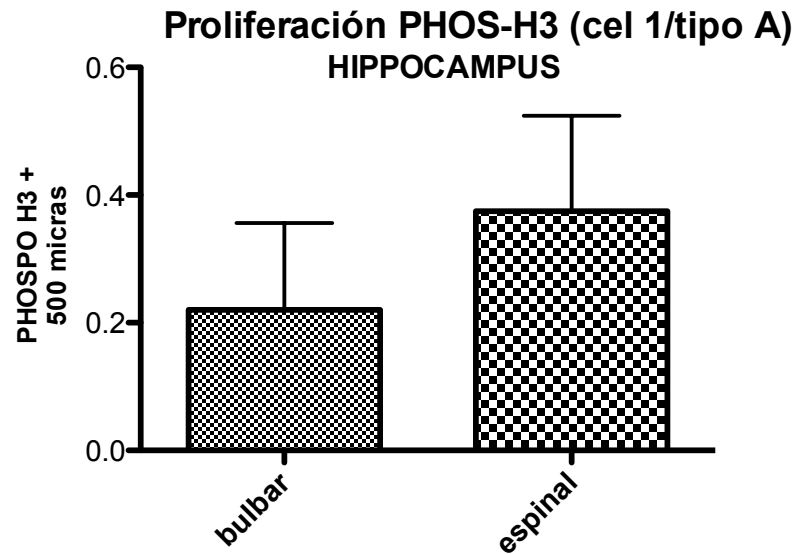


Gráfico 89: Número de células madre neurales progenitoras tipo 1/tipo A en la SGZ de pacientes según la forma de inicio. No se observan diferencias significativas en la proliferación de las células pluripotenciales entre los pacientes que inician la clínica con forma bulbar y espinal

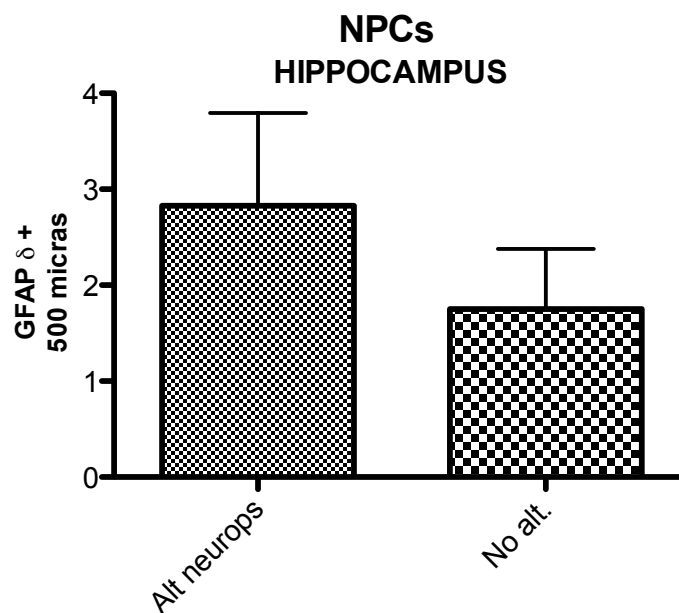


Gráfico 90: Cantidad de NPCs, células tipo2 /tipo D1 en la SGZ de pacientes con ELA según la presencia o ausencia de alteraciones neuropsiquiátricas. No se observan diferencias significativas en el número de NPCs en los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.

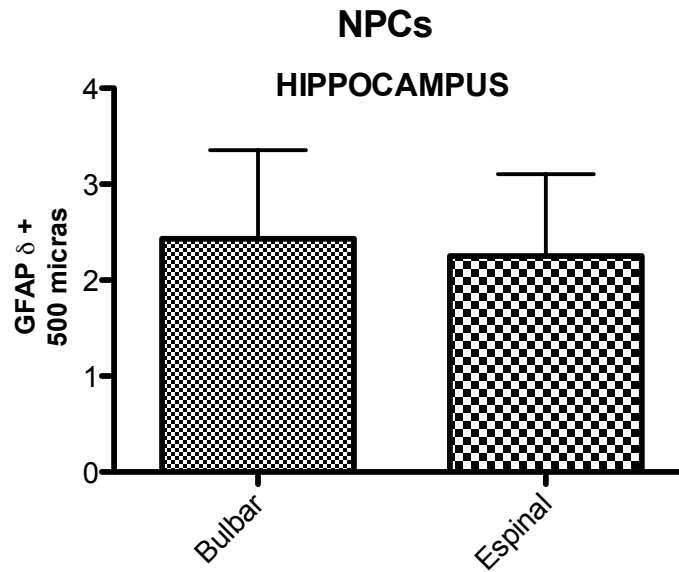


Gráfico 91: Número de NPCs marcadas con GFAP δ en la SGZ de pacientes con ELA según su forma de inicio. No existen diferencias significativas en el número de NPCs marcadas en los pacientes según su forma de inicio bulbar o espinal.

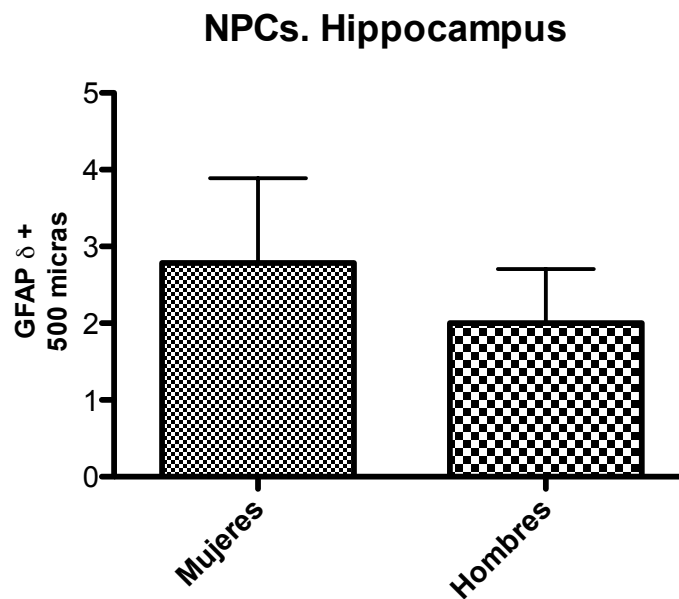


Gráfico 92: Gráfico 89: Número de NPCs marcadas con GFAP δ en la SGZ de pacientes con ELA según sexo. No se observan diferencias significativas en las células NPCs (tipo 2) marcadas con GFAP δ en el hipocampo según el sexo de los pacientes.

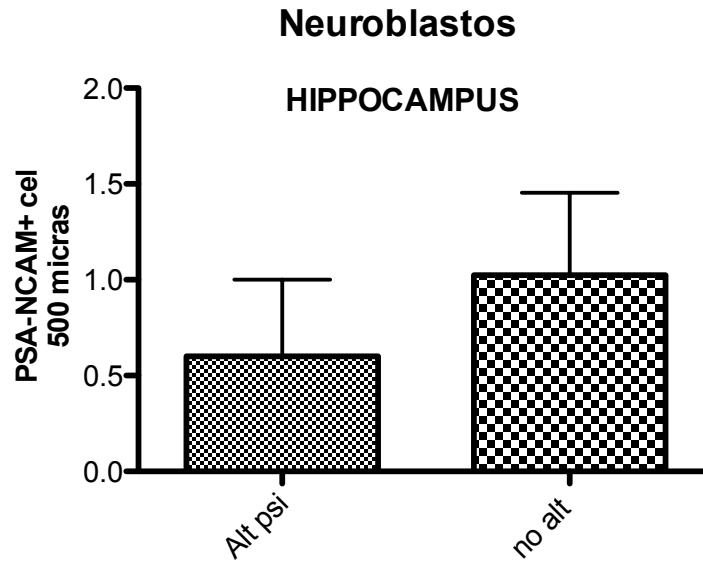


Gráfico 93: Números de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en el hipocampo de pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas. No existen diferencias significativas en el número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en los pacientes con o sin alteraciones neuropsiquiátricas.

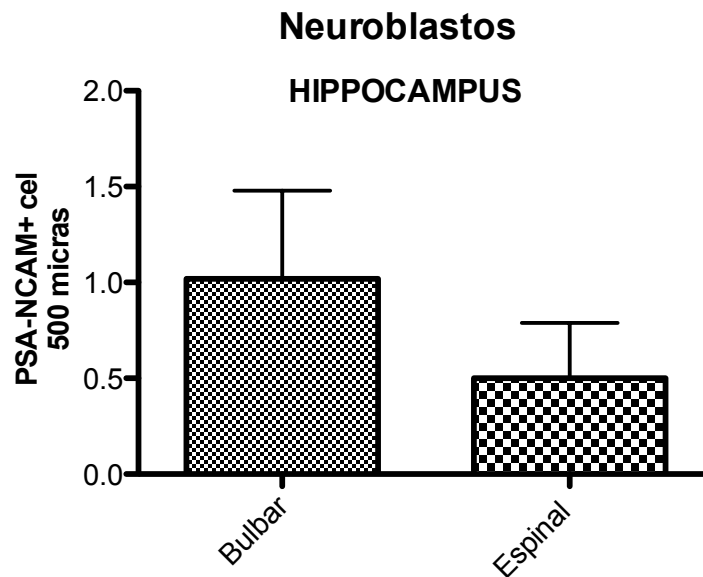


Gráfico 94: Números de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en el hipocampo de pacientes según su forma de inicio. No existen diferencias significativas entre el número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM en el giro dentado de los pacientes con formas bulbares o espinales.

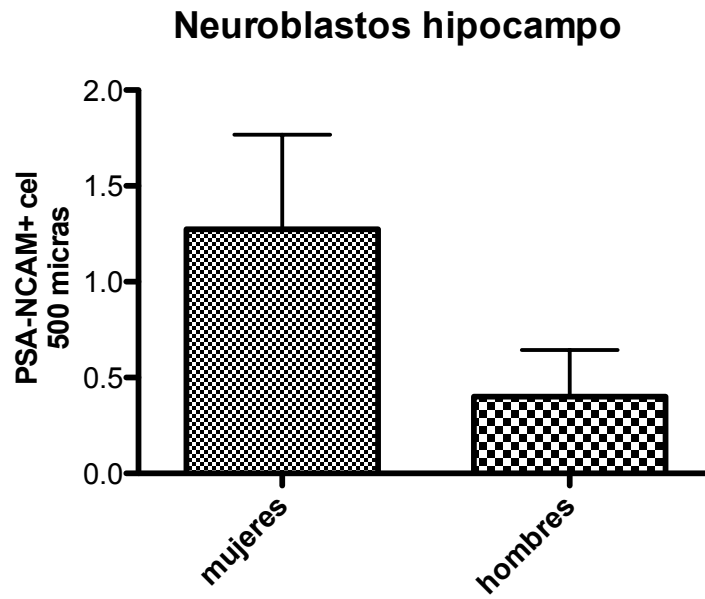


Gráfico 95: Neuroblastos marcados con PSA-NCAM en la SGZ de los pacientes según su **sexo**. No se observan diferencias significativas en el número de neuroblastos marcados con PSA-NCAM de la SGZ según el sexo de los pacientes.

XII. b. Artículos



Subventricular zone in motor neuron disease with frontotemporal dementia

Lucia Galan^{a,*,1}, Ulises Gomez-Pinedo^{b,c,e,g,1}, Alvaro Vela-Souto^a, Antonio Guerrero-Sola^a, Juan Antonio Barcia^c, Alberto Rábano Gutierrez^d, Armando Martinez-Martinez^e, Maria Sagrario Barquero Jiménez^{f,2}, Jose Manuel García-Verdugo^b, Jorge Matias-Guiu^f

^a Neuromuscular Unit, Neurology Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Príncipe Felipe/Universidad de Valencia, Mix Unit/CIBERNED, Valencia, Spain

^c Neurosurgery Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain

^d Pathology Department and Brain Bank, Research Unit Alzheimer Project, Fundación CIEN, ISCIII, Madrid, Spain

^e Neurology Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain

^f Pathology Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain

^g Neuroscience Institute, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2011

Received in revised form 6 April 2011

Accepted 9 May 2011

Keywords:

Amyotrophic lateral Sclerosis

Neurogenesis

Frontotemporal lobar degeneration

Motor neuron disease

Subventricular zone

ABSTRACT

Investigate how the subventricular proliferation and organisation is modified in a patient with FTLD-ALS. We studied the subventricular zone (SVZ) of a patient with FTLD-ALS immunohistochemical and histologically. We found an increase of Ki-67 positive cells and neuroblast in the subventricular zone, suggesting an activation of proliferating activity in response to FTD-ALS. This proliferation can act as a compensatory mechanism for rapid neuronal death and its modulation could provide a new therapeutic pathway in ALS. These results suggest a modification of neurogenesis in FTD-ALS.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Neuronal ubiquitin-positive inclusions are the pathological hallmark of most forms of FTLD (Frontotemporal lobar degeneration), FTLD with Amyotrophic Lateral Sclerosis (FTLD-ALS) and sporadic ALS and most familial ALS but not in superoxide dismutase (SOD) linked familial ALS [18]. Recently it has been found that the major component of these inclusions is a form of TDP-43 [12]. The only treatment approved for ALS is riluzole, which has a moderate effect in survival [1]. As an alternate to pharmacological therapies, stem cell therapy, has emerged with contradictory results [14,4]. Additionally, the role of endogenous neurogenesis in ALS is unknown.

In the last years, neurogenesis has been described in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus and subventricular zone of the lateral ventricle (SVZ) of adult mammals, including humans [6,16,15]. Recent studies in humans elucidated the cellular composition and architecture of the SVZ and described a monolayer of ependymal cells, a hypocellular gap, an astrocytes ribbon and a transitional zone [15]. Recent publications suggest

that in neurodegenerative diseases and ischemia/stroke, neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation is altered [3,13,19].

The objective of this study is to investigate how subventricular proliferation and organisation is modified in a patient with FTLD-ALS.

A 65 years female patient consulted for mood changes, aphasia and slight amnesia. Clinical and complementary studies (supplementary data) permitted the diagnosis of FTLD. A year after, she developed motor neuron disease with clinical and neurophysiological criteria (supplementary data), leading to the diagnosis of FTLD-ALS. The patient presented severe dysphagia. A percutaneous gastrostomy was performed but she died the day after without receiving treatment with riluzole or mechanical ventilation.

Five hours after autopsy, the brain was fixed in 10% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for five days. Macroscopic examination shows frontal ventricular dilatation and thin anterior spinal roots.

Microscopic examination shows atrophy of the spinal anterior horn with severe loss of lower motor neurons, and few remnant ganglionic cells, some of them showing ubiquitinated inclusions. Diffuse plaques and some neuritic plaques with amyloid core were observed in neocortex and the amygdala. Immunohistochemistry against ubiquitin and TDP-43 reveals immunopositive cytoplasmic

* Corresponding author at: Neurology Department, Hospital Clinico San Carlos Calle, Plaza Profesor Martin Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913303511; fax: +34 913303512.

E-mail address: elainvestigacion@luciagalán.es (L. Galan).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Unexpectedly deceased on May 2009.

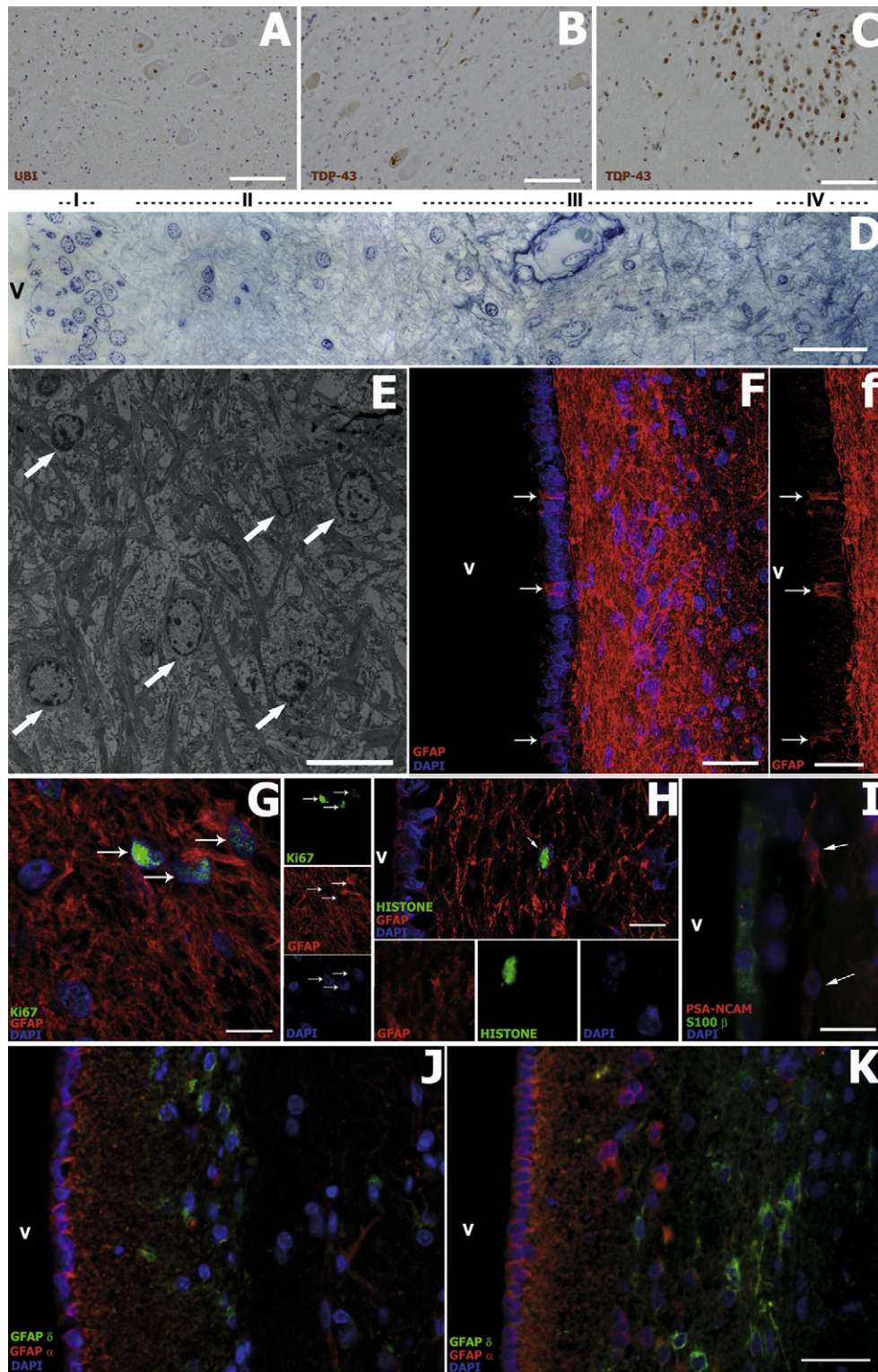


Fig. 1. FTD and SVZ. FTD diagnoses (A–C). A ubiquitin inclusions in neuronal cells and B–C TDP-43 immunopositive cells in cortex and hippocampus. Morphology of the aSVZ human (D–I). (D) Semithin section of aSVZ showing the lateral ventricle (V), ependymal layer (I), the gap layer (II), ribbon layer (III), and parenchyma (IV). (E) Ultrathin section of astrocytes in the gap layer of the aSVZ (arrows), the astrocytes showing the abundant intermediate filaments. (F and f) Astrocytes in the aSVZ, showing abundant projections GFAP positive, contacting the ventricular cavity (arrows). G, H, Increase in cell proliferation of the aSVZ. Ki-67 positive cells (arrows) and histone positive cell in the gap layer (arrow). (I, J), Fluorescence images of GFAP- δ stained cells (green cells) of the cSVZ and aSVZ showing the abundant cells around SVZ (in comparison with the cSVZ/aSVZ). (K) Fluorescence images of PSA-NCAM stained cells (arrows) of the aSVZ showing their elongated morphology. Scale Bar: (A, B), 40 μ m; (C) 60 μ m; (D) 40 μ m; (E) 10 μ m; (F–f) 40 μ m; (G) 12 μ m; (H) 20 μ m; (I–J) 45 μ m; (K) 15 μ m. (V) ventricle.

Table 1
Antibodies.

Antibody	Host	Dilution	Source/catalog	Immunogen	Description
Primary antibodies					
Ubiquitin	Rabbit	1:100	Abcam/ab7780	Recombinant full length protein (human)	Specifically recognizes ubiquitinated cytoplasmic inclusion bodies
TDP43	Rabbit	1:100	Cell signaling/3449	Synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to residues surrounding Ala260 of human TDP43	TDP43 (TAR DNA-binding protein 43) is involved in transcriptional regulation and exon splicing
Ki-67	Mouse	1:100	Dako/M 7240	Human recombinant peptide corresponding to a 1002 bp Ki-67 cDNA Fragment	Marker of proliferating cells (all phases of cell cycle except G0)
S100	Rabbit	1:1	Immunostar/22520	S100 protein isolated from bovine brain	Ependymal and glial marker in the central nerve system
Histone 3	Rabbit	1:200	Cell signaling/9701	Synthetic phospho-peptide (KLH-coupled) corresponding to residues surrounding Ser10 of human histone H3	Marker of proliferating cells (S phase)
PSA-NCAM	Mouse	1:400	AbCys/AbC0019 Clone 355	Meningococcus group B (strain 355)	Marker of migrating neuroblasts
Tuj1	Chicken	1:500	Millipore/AB9354	Neuronal class III β -Tubulin	Early neuronal marker
GFAP- δ	Rabbit	1:500	Millipore/AB9598	Glial fibrillary acidic protein	Marker of astrocytes isoform δ (only), does not recognize GFAP- α -astrocytes
GFAP	Rabbit	1:600	Dako/Z0334	Glial fibrillary acidic protein	Astrocytes marker
GFAP	Mouse	1:600	Sigma/C9205Clone G-A-5 Cy3	Glial fibrillary acidic protein	Astrocytes marker
Antibody			Host	Dilution	Source/catalog
Secondary antibody					
Peroxidase anti Rabbit IgG			Goat	1:200	Vector Labs, PI-1000
Alexa Fluor 488 anti Chicken 1gG			Goat	1:500	Invitrogen A11039
Alexa Fluor 555 anti Mouse 1gG			Goat	1:500	Invitrogen A21424
Alexa Fluor 555 anti Mouse 1gM			Goat	1:500	Invitrogen A21426
Alexa Fluor 488 anti Mouse 1gG			Goat	1:500	Invitrogen A11029
Alexa Fluor 647 anti Rabbit 1gG			Goat	1:500	Invitrogen A21245

inclusions in spinal, bulbar and pyramidal motor neurons, amygdala and hippocampus as the predominant neuropathology fact (Fig. 1A–C). A diagnosis of FTL-ALS associated with mild pathological changes of Alzheimer Disease was made [17].

For immunohistochemical analysis (of the SVZ), the specimen was cut on a vibratome (40 μ m sections). Tissue sections were thoroughly rinsed in 0.1 MPBS. Antibodies used for the immunohistochemical techniques are described in Table 1. The methodology performed for the immunoperoxidase, immunofluorescence and electron microscopy techniques were carried out following the protocol described in the article of Marti-Fabregas et al. [13] (supplementary data).

We restricted our study to the central body of SVZ. We compared the organisation of the SVZ in the patient with FTD-ALS (aSVZ) with a control (cSVZ) from a patient without neurological pathology, with similar age and sex. We did not detect changes in the ependymal cell layer (see Table 2).

In the aSVZ, we observed a prominent hypocellular gap layer, with a mean thickness of $96 \pm 19.8 \mu$ m while in the cSVZ it was $51 \pm 9 \mu$ m (Fig. 1D–II and E). One important difference was that the gap layer in the aSVZ contained abundant cellular bodies that ultrastructurally corresponded with astrocytes. The astrocytes of aSVZ had large cytoplasm, large expansions, abundant organelles and abundant intermediary filaments. Moreover, the aSVZ ribbon layer was wider ($126.69 \pm 35 \mu$ m) (Fig. 1, D–III) than the cSVZ ribbon layer ($59.51 \pm 10.9 \mu$ m) (Fig. 1D).

Using GFAP was confirmed found the majority of cells in the gap layer and aSVZ ribbon was astrocytes. Also, the expression of GFAP in the aSVZ showed abundant GFAP positive projections, contacting the ventricular cavity (Fig. 1F–f).

To examine whether the disease has any effect on SVZ proliferation, we performed immunohistochemistry with Ki-67, PCNA and

Histone, and we detected an increased cell proliferation (Fig. 1G and H). The aSVZ showed 5-fold increase in cell proliferation compared to the cSVZ. The Ki-67 data showed an increase of the cells labelled in the aSVZ (83 ± 11 cells per mm^2) compared to the cSVZ (16 ± 8 cells per mm^2). We observed a high percentage of GFAP/Ki-67. To confirm the data obtained with Ki-67 we performed Histone 3 immunohistochemistry. We found an increase of Histone labelling in the aSVZ (2-fold increase) compared to the cSVZ (Fig. 1H). To differentiate between reactive gliosis and neuroblast proliferation, we performed an immunohistochemistry with GFAP- δ , specifically expressed in stem cells in the human SVZ [20,13]. We found an increase of GFAP- δ labeling in the ribbon layer of the aSVZ (2-fold increase) compared to the cSVZ (Fig. 1I and J).

We used PSA-NCAM for migrating cells (neuroblasts) and Tuj-1 for immature neurons. In the aSVZ, there was a 4-fold increase in PSA-NCAM positive cells (60 ± 19 cells per mm^2) compared to the cSVZ (14 ± 6 cells per mm^2 , $P < 0.05$) (Fig. 1K). These cells had an elongated morphology and were not organized in migrating chains as in the rodent brain. The percentage of PSA-NCAM positive cells within aSVZ layers corresponded to 57% in the gap layer, 22% in the transition from gap to ribbon layer and 21% in the ribbon layer. Interestingly, in the cSVZ, the distribution of immunopositive cells was 31% in the gap layer, 17% in the transition area and 52% in the ribbon layer. Some cells and tangential expansions, in gap and ribbon layers, were stained with Tuj1. We rarely observed sporadic Tuj1-positive cells in the cSVZ.

This study provides evidence of human SVZ activation in response to FTL-ALS. Although proliferation persists in the adult human brain, it is not clear whether effective neuroregeneration occurs. We found a five-fold increase of proliferative Ki-67-positive cells in the gap and ribbon layers. This finding indicates that in this case proliferation of the SVZ may occur. This active proliferation

Table 2
Histological changes in the SVZ.

	Ependymal cell layer	GAP layer (μm)	Ribbon layer (μm)	Ki67 cells (mm ²)	PCNA cells (mm ²)	Histone 3 cells (mm ²)	GFAP-δ cells (mm ²)	PSA-NCAM cells (mm ²)
Control	No changes	51 ± 9	59.51 ± 10	16 ± 8	28 ± 7	4 ± 2	19 ± 3	14 ± 6
ALS	No changes	96 ± 19.8	126.69 ± 35	83 ± 11	106 ± 9	11 ± 8	41 ± 5	60 ± 19
p = (Wilcoxon signed ranks test)		0.0059	0.002	0.002	0.0059	0.008	0.0058	0.002

confirms some previous studies in other pathologies such as stroke [13].

We found a 5-fold increase in the number of Ki-67+ cells in the aSVZ. Moreover, we detected a high percentage of GFAP/Ki67 co-labelled cells.

This result is in agreement with previous studies that reported that the human astrocytes of the ribbon layer corresponded to stem cells (NPC) [16,15,20]. An important data in aSVZ, is a greater expression of GFAP-δ in the layer ribbon of which was considered NPC in the human brain [20,13].

The increased GFAP projection in contact with SVZ could be considered a proliferative cellular response in rodents where it has been linked with cell proliferation [5]. In humans, these contacts have been described but it is not known the state of these contacts in relation with age or neurodegenerative diseases.

Probably, as a result of the NPC proliferation there is a 4-fold increase of PSA-NCAM-positive cells in the aSVZ compared with the cSVZ, which can indicate an increase in neuroblasts. An increase in PSA-NCAM immunostained cells was also reported in other pathologies [13,2]. In addition, we found Tuj-1+ cells in the aSVZ that represented migrating and immature neuroblasts, indicating that most probably there is not only proliferation but also migration of neuroblasts. Interestingly, there is a change also in the distribution of PSA-NCAM-positive cells in the aSVZ. There are clear increases in the percentage of immunopositive cells at the gap layer. This increase suggests that the gap layer might have an important role in the migration of neuroblasts. However, we do not know the destination of these cells or if they will achieve integration. It is likely that the cause of death, the characteristics of the agonic state and the time from death to necropsy may influence our results. On the other hand, we present just one case, with a very severe progression of clinical and we cannot be completely sure of the applicability of this finding to other cases.

The modification of neurogenesis found in other neurodegenerative diseases is usually a reduction, with some reports of increased neurogenesis in AD necropsies [19,9,8].

The organisation of neurogenesis is not clear when studied in ALS animal models [10,11]. It is necessary to be extremely cautious when applying the results obtained with rodent ALS models to humans, primarily because the organisation of the human SVZ is different from that in rodents, since in humans the hypocellular layer separates the ependymal layer from the cellular (ribbon) layer. Secondly because rodents ALS models are mainly SOD models who do not apply well for others forms of ALS.

The functional impact of this phenomenon in patients with ALS is uncertain, although in experimental animals, the number of newborn neurons that survive is too small for the recovery of neurological functions [7]. It will be also interesting to know the state of neurogenesis in the cases of ALS without FTLD, and in other cases of FTDL-ALS. Assuming that the NPC reacts in the human brain after ALS, it could be advisable to design new therapeutic strategies to promote endogenous neurogenesis.

Acknowledgements

The confocal microscopy was carried out by Confocal Microscopy Service at the Centro de Investigación Príncipe Felipe

(Valencia, Spain). We are grateful to I. Borreda-Gascó and M. Soriano for expert technical assistance. We also thanks to Dr. Salome Sirel, Dr. Almudena Conde and Ashleigh Burns for their helpful comments on the manuscript. This research is funded by the cooperation agreement between the Carlos III Health Institute, the Ministry of Health of the Generalitat Valenciana and the Foundation of the Valencian Community Prince Felipe Research Centre (PROMETEO).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neulet.2011.05.019.

References

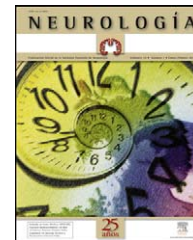
- [1] G. Bensimon, L. Lacomblez, V. Meininger, A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 585–591.
- [2] A. Crespel, V. Rigau, P. Coubes, M.C. Rousset, F. de Bock, H. Okano, M. Baldy-Moulinier, J. Bockaert, M. Lerner-Natoli, Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy, *Neurobiol. Dis.* 19 (2005) 436–450.
- [3] M.A. Curtis, E.B. Penney, J. Pearson, M. Dragunow, B. Connor, R.L. Faull, The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain, *Neuroscience* 132 (2005) 777–788.
- [4] H. Deda, M.C. Inci, A.E. Kurekci, A. Sav, K. Kayihan, E. Ozgun, G.E. Ustunsoy, S. Kocabay, Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up, *Cytotherapy* 11 (2009) 18–25.
- [5] F. Doetsch, L. Petreanu, I. Caille, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells, *Neuron* 36 (2002) 1021–1034.
- [6] P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, F.H. Gage, Neurogenesis in the adult human hippocampus, *Nat. Med.* 4 (1998) 1313–1317.
- [7] S. Ge, K.A. Sailor, G.L. Ming, H. Song, Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus, *J. Physiol.* 586 (2008) 3759–3765.
- [8] X.P. Hong, C.X. Peng, W. Wei, Q. Tian, Y.H. Liu, X.Q. Yao, Y. Zhang, F.Y. Cao, Q. Wang, J.Z. Wang, Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis, *Hippocampus* (2009).
- [9] K. Jin, A.L. Peel, X.O. Mao, L. Xie, B.A. Cottrell, D.C. Henshall, D.A. Greenberg, Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 343–347.
- [10] L. Juan, Z. Dawei, A.D. Julie, Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide dismutase 1(G93A) (G1H) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Neurol. Res.* 29 (2007) 204–209.
- [11] Z. Liu, L.J. Martin, The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain, *J. Comp. Neurol.* 497 (2006) 468–488.
- [12] I.R. Mackenzie, E.H. Bigio, P.G. Ince, F. Geser, M. Neumann, N.J. Cairns, L.K. Kwong, M.S. Forman, J. Ravits, H. Stewart, A. Eisen, L. McClusky, H.A. Kretschmar, C.M. Monoranu, J.R. Highley, J. Kirby, T. Siddique, P.J. Shaw, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 427–434.
- [13] J. Martí-Fabregas, M. Romaguera-Ros, U. Gomez-Pinedo, S. Martinez-Ramirez, E. Jimenez-Xarrie, R. Marin, J.L. Martí-Vilalta, J.M. Garcia-Verdugo, Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke, *Neurology* 74 (2010) 357–365.
- [14] J. Matías-Guiu, J.A. Barcia, J.M. García-Verdugo, L. Galán, A. Vela, R. Garcia-Ramos, Cellular therapy in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurologia* 23 (4) (2008) 226–237.
- [15] A. Quinones-Hinojosa, N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M.S. Berger, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells, *J. Comp. Neurol.* 494 (2006) 415–434.

- [16] A. Quinones-Hinojosa, N. Sanai, M. Soriano-Navarro, O. Gonzalez-Perez, Z. Mirzadeh, S. Gil-Perotin, R. Romero-Rodriguez, M.S. Berger, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration, *Nature* 427 (February (6976)) (2004) 740–744.
- [17] T. Takeda, T. Uchihara, N. Arai, T. Mizutani, M. Iwata, Progression of hippocampal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis with or without memory impairment: distinction from Alzheimer disease, *Acta Neuropathol.* 117 (2009) 35–44.
- [18] R. Tandan, W.G. Bradley, Amyotrophic lateral sclerosis. Part 1: clinical features, pathology, and ethical issues in management, *Ann. Neurol.* 18 (1985) 271–280.
- [19] A. Thompson, K. Boekhoorn, A.M. Van Dam, P.J. Lucassen, Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav.* 7 (Suppl1) (2008) 28–42.
- [20] S.A. van den Berge, J. Middeldorp, C.E. Zhang, M.A. Curtis, B.W. Leonard, D. Mastroeni, P. Voorn, W.D. van de Berg, I. Huitinga, E.M. Hol, Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta, *Aging Cell.* 33 (2010) 1–14.



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



EDITORIAL

Terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica: ciencia y controversia

L. Galán^{a,*}, A. Guerrero-Sola^a, U. Gómez-Pinedo^b y J. Matias-Guiu^c

^a Unidad de ELA, Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

^b Centro de Investigación Príncipe Felipe y CIBERNED, Valencia, España

^c Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

Recibido el 26 de febrero de 2010; aceptado el 27 de febrero de 2010

Accesible en línea el 17 Septiembre 2010

PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral
amiotrófica;
Células madre;
Enfermedad
neurodegenerativa;
Terapia celular

KEYWORDS

Amyotrophic lateral
sclerosis;
Stem cells;
Neurodegenerative
disease;
Cell therapy

Resumen La terapia con células madre se vislumbra como una posible terapia alternativa al tratamiento de diferentes patologías degenerativas, entre las cuales se encuentra la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En la actualidad, a pesar de que existen trabajos de investigación básica con esta terapia en la ELA, todavía quedan sin esclarecer los mecanismos de actuación de las células madre implantadas, además de no tener claro el tipo de células a utilizar (medula ósea, grasa, pulpa dentaria, etc.) y vía de administración más idónea. A su vez, existen ensayos clínicos con células madre mesenquimales con resultados poco concluyentes, por lo que no se ha podido establecer con contundencia como una terapia alternativa en ELA o cualquier otra enfermedad neurodegenerativa. A pesar de las evidencias científicas, en los últimos años han aparecido diferentes clínicas que ofrecen tratamientos con células madre para enfermedades neurodegenerativas, dando lugar a lo que se conoce como “turismo celular”. Este fenómeno ha activado alarmas y reacciones en la comunidad científica. La aplicación de estas terapias se debe realizar siguiendo las normas de buena práctica clínica en investigación, la metodología basada en la evidencia y las recomendaciones éticas y científicas internacionales.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: science and controversy

Abstract Stem cell therapy is seen as a possible alternative for the treatment of different degenerative diseases, among which includes amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Despite there being basic research works with this therapy in ALS, the mechanism of action of the implanted cells are still unclear. It is also unclear which type of cells to use (bone marrow, fat, dental pulp, etc.), or the most ideal administration route. Furthermore, clinical trials with mesenchymal stem cells are not very conclusive, therefore it has not been convincingly established

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: elainvestigacion@lucigalan.es (L. Galán).

as an alternative therapy in ALS or any other neurodegenerative disease. Despite the scientific evidence, several clinical trials have been conducted in the last few years that offer stem cell treatments for neurodegenerative diseases, giving rise to what is known as "cellular tourism". This phenomenon has set off alarms and reactions in the scientific community. The application of these therapies must be performed following the good clinical practice guidelines in research, evidence based methodology and international ethical and scientific recommendations.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa con un único tratamiento aprobado, el riluzole, cuyo efecto es moderado¹. En los últimos años, la terapia celular ha despertado un gran interés científico y social, ya que supone explorar nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades que hasta ahora no tienen tratamiento, como las enfermedades neurodegenerativas². Sin embargo, sus indicaciones aprobadas son mínimas². En el caso de la ELA, al igual que en las otras enfermedades neurodegenerativas, a pesar de una intensa investigación básica, no existe suficiente evidencia sobre la eficacia de este tipo de terapia^{3,4} ni sobre su seguridad⁵ como para poder aprobar su indicación, aunque sí se ha podido avanzar en la realización de algunos ensayos clínicos⁶⁻⁹, fundamentalmente con células madre mesenquimales.

La ELA presenta algunas características que la hacen especial a la hora de considerar la terapia celular. La primera es que su etiopatogenia es desconocida¹⁰. Además, en los últimos años se ha puesto de manifiesto en la etiopatogenia de la ELA la importancia de las células que forman el ambiente de las motoneuronas¹¹. La segunda es que se desconoce la forma en que la enfermedad se difunde en el humano¹², con la consiguiente dificultad de elección del sitio ideal de implantación de las células.

El efecto de la terapia celular en la ELA se podría producir por sustitución de las células implantadas por otros tipos celulares dañados. Parece lógico pensar que en el caso de la ELA, las células que deban ser sustituidas sean las motoneuronas. Esa sustitución, requeriría el desarrollo de conexiones con otras neuronas y crecimiento axonal en el músculo diana. Sin embargo, estas estrategias sólo parecen efectivas en los modelos de daño estático y no de daño progresivo como es la ELA^{13,14}. A pesar de ello, y por un posible efecto sobre otras neuronas, se ha aprobado recientemente por la FDA la realización de un ensayo clínico con células madre neurales en pacientes con ELA. El recambio a astrocitos o a microglia podrían tener un papel más importante¹⁵.

Pero la estrategia más prometedora de las células madre consiste en la liberación de los factores neurotróficos y la modulación de la inflamación. Cuando las células madre precursoras se modifican para expresar GDNF y se implantan en ratas transgénicas SOD previenen la degeneración de las motoneuronas, si se administran además en el músculo mejoran la función motora^{16,17}.

Es este mecanismo el que consigue dar lugar a neuroprotección en los modelos transgénicos para la SOD de ELA¹⁸. Por ello se llegó a la realización de un ensayo clínico con células mesenquimales exógenas intramedular en localización torácica⁸ y en otro implantación cervical⁹; ambos eran ensayos abiertos y en ellos se describe un discreto beneficio para los pacientes.

También las células procedentes de cordón umbilical mostraron un efecto beneficioso en el modelo animal a

través de la función inmune¹⁹. En humanos se ha llevado a cabo el trasplante de células autólogas hematopoyéticas a nivel frontal en una pequeña parte de pacientes⁷.

Beers et al llevaron a cabo una serie de experimentos para identificar el papel de la microglia y las células CD4+ en el daño a las motoneuronas trasplantando células de médula ósea en ratones transgénicos para la SOD cruzados con ratones que carecen de CD4+. La falta de células T aceleraba la progresión de la enfermedad, pero su reintroducción a través del trasplante de médula ósea daba lugar a neuroprotección²⁰.

Otra estrategia de actuación sería la estimulación de la neurogénesis endógena presente en los nichos neurogénicos del SNC del paciente con ELA (esta vía ya ha sido propuesta en otras enfermedades), pero hasta el momento no se usa³.

En conclusión, la terapia celular en la ELA se encuentra todavía en una fase muy preliminar; aunque se han realizado algunos ensayos clínicos sus resultados son difíciles de interpretar, dado el pequeño número de pacientes y la falta de homogeneidad de sus diseños. Sigue siendo una incógnita cuál es el tipo celular idóneo, la vía o el sitio anatómico óptimo para la introducción de las células. La mayoría de los grupos consideran, por ello, que es necesario realizar más estudios básicos antes de avanzar a la clínica²¹.

El turismo celular

A pesar del estado tan precoz en el que se encuentra la terapia celular, en los últimos años han aparecido en el mercado numerosas clínicas que ofrecen a través de Internet tratamiento con células madre en diferentes patologías, fundamentalmente en enfermedades neurodegenerativas. Estas clínicas se encuentran generalmente en países con legislaciones más laxas. Los tratamientos se realizan, además, a un coste bastante alto, sin contar el que supone el traslado del paciente.

En el año 2008 científicos de la Universidad de Alberta²² realizaron un brillante trabajo que causó un enorme impacto entre la comunidad científica. En él analizaban las clínicas que ofrecían tratamientos con células madre en Internet, realizando una búsqueda a partir de Google. En él encontraron que todas las clínicas menos una ofrecían tratamiento para indicaciones no aprobadas y que en la mayor parte de ellas existía una sobreestimación de la eficacia del mismo y una subestimación de los riesgos. Este artículo dio lugar a que la Sociedad para la Investigación sobre células madre publicara una guía para la investigación responsable con las mismas²³.

Recientemente se ha publicado el caso de un paciente que años después de un trasplante de células madre presentó tumores múltiples en el SNC, que cuando fueron analizados presentaban genotipos masculinos y femeninos,

por lo que eran al menos de dos donantes⁵. Este caso ha avivado la polémica sobre la utilización de este tipo de terapias.

En nuestra opinión, la terapia celular debe continuar siendo estudiada a través de estudios básicos y ensayos clínicos bien diseñados. Su aplicación fuera de estos ámbitos, cuando se realice, debe ser igualmente controlada y revisada de forma externa para asegurar que se cumplen estándares de calidad, seguridad y ética, siguiendo las guías de actuación de la ISSCR²³.

Bibliografía

- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*. 1994;330:585–91.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders-time for clinical translation? *J Clin Invest*. 2010;120:29–40.
- Matias-Guiu J, Barcia JA, García-Verdugo JM, Galán L, Vela A, García-Ramos R. Terapia celular en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. *Neurología*. 2008;23:226–37.
- Papadeas ST, Maragakis NJ. Advances in stem cell research for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(5):545–51.
- Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med*. 2009;6:e1000029.
- Appel SH, Engelhardt JI, Henkel JS, Siklos L, Beers DR, Yen AA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008;71:1326–34.
- Martínez HR, González-Garza MT, Moreno-Cuevas JE, Caro E, Gutiérrez-Jiménez E, Segura JJ. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy*. 2009;11:26–34.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008;265:78–83.
- Deda H, Inci MC, Kurekci AE, Sav A, Kayihan K, Ozgun E, et al. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy*. 2009;11:18–25.
- Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2007;369:2031–41.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006;52:39–59.
- Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focal, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology*. 2009;73:805–11.
- Gao J, Coggeshall RE, Tarasenko YI, Wu P. Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience*. 2005;131:257–62.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002;110:385–97.
- Lepore AC, Rauck B, Dejea C, Pardo AC, Rao MS, Rothstein JD, et al. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci*. 2008;11:1294–301.
- Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P, et al. GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS One*. 2007;2:e689.
- Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Hayes A, Bellantuono I, et al. Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther*. 2008;16:2002–10.
- Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2008;31:395–405.
- Garbuzova-Davis S, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Willing AE, Gemma C, Bickford PC, et al. Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PLoS One*. 2008;3:e2494.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15558–63.
- Badayan I, Cudkovic ME. Is it too soon for mesenchymal stem cell trials in people with ALS? *Amyotroph Lateral Scler*. 2008;9:321–2.
- Lau D, Ogbogu U, Taylor B, Stafinski T, Menon D, Caulfield T. Stem cell clinics online: the direct-to-consumer portrayal of stem cell medicine. *Cell Stem Cell*. 2008;3:591–4.
- Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, Cattaneo E, Cavazzana-Calvo M, Cossu G, et al. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2008;3:607–9.

J. Matías-Guiu¹
J. A. Barcia²
J. M. García-Verdugo³
L. Galán¹
A. Vela¹
R. García-Ramos¹

Terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica

Servicios de ¹Neurología y ²Neurocirugía
Instituto de Neurociencias
Hospital Clínico San Carlos
Universidad Complutense
Madrid

³Centro de Investigación Príncipe Felipe
Universidad de Valencia
Valencia

Introducción. El posible papel del implante de células pluripotenciales en la terapéutica frente a lesiones traumáticas o por enfermedad ha sido planteado en los últimos años. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una de las enfermedades donde la terapéutica celular puede ser útil.

Desarrollo. Los autores llevan a cabo una revisión analítica de los estudios realizados tanto en humanos con ELA como en el modelo transgénico G93A de roedores para evaluar el efecto de los implantes de células en estas situaciones. Asimismo, revisan la respuesta celular procedente de las células NSC-EZ de la médula.

Conclusiones. La investigación sobre la potencial utilización de la terapia celular en el abordaje de la ELA está en progresión y los diferentes estudios realizados son poco homogéneos. Por ello restan muchas preguntas por responder como cuál es el tipo de células más adecuado para implantar, cuál debe ser el volumen del implante para conseguir el mejor, cuál es la vía de implantación, y en el caso de implantes en médula espinal, cuál es el lugar donde implantar o cuál es la necesidad de administración de sustancias concomitantes, especialmente los inmunosupresores.

Palabras clave:
Células madre. Células madre neurales. Esclerosis lateral amiotrófica. Enfermedad de motoneurona. Terapia celular.

Neurología 2008;23(4):226-237

Cellular therapy in amyotrophic lateral sclerosis

Introduction. The possible role of stem cells transplantation in therapy for traumatic lesions or for diseases has been outlined in recent years. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is one of the diseases where cellular therapy may be useful.

Development. The authors make an analytic review of the studies carried out in humans with ALS and in G93A transgenic rodent model of ALS to evaluate the effect of stem cell transplantation. They also review cellular responses from NSC-EZ cells in the spinal cord.

Conclusions. Research on the potential uses of cellular therapy for ALS is on-going, however, the different studies are not homogeneous. Thus, many questions need to be answered, such as which is the most appropriate type of cells or which should be the volume of cells to implant, which is the best method for the transplantation and in the case of spinal cord implant which is the best target for the implant, or if it is necessary to administer concomitant substances, such as immunosuppressant drugs.

Key words:
Stem cells. Neural stem cells. Amyotrophic lateral sclerosis. Motor neuron disease. Cellular therapy.

INTRODUCCIÓN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que causa una pérdida de la función motora causada por lesión y muerte de las motoneuronas en cerebro, tronco cerebral y médula. Aunque su primera descripción patológica fue realizada por Charcot y Joffroy en 1869¹, todavía hoy día es una enfermedad de mecanismo desconocido. Su prevalencia oscila entre 4 a 6 casos por 100.000 habitantes, aunque algunos autores sugieren que esta tasa puede estar aumentando debido al envejecimiento de la población², con un discreto predominio en mujeres. La edad media de inicio suele estar entre los 50 y 60 años, aunque existen casos más precoces y también de comienzo posterior. Aproximadamente un 10% de los casos de ELA son hereditarios³, y de ellos sobre un 25% parecen estar asociados a una mutación en la superóxido dismutasa-1 (SOD1)⁴. Aunque su curso clínico es variable, el inicio suele ser focal, pero posteriormente existe una afectación generalizada. Las motoneuronas gradualmente disminuyen su funcionamiento y mueren, provocando debilidad y atrofia muscular que afecta a la musculatura espinal y/o bulbar, con alteración en el

Correspondencia:
Jorge Matías-Guiu
Instituto de Neurociencias
Hospital Clínico San Carlos
Av. Prof. Martín Lagos, s/n
28010 Madrid
Correo electrónico: inc.hsc@salud.madrid.org

Recibido el 26-10-07
Aceptado el 10-12-07

habla, en la deglución y en la musculatura respiratoria. La esperanza de vida es variable, aunque se estima en una media de 3 a 5 años y no existe tratamiento curativo de la enfermedad. Dado que el uso de la terapia celular con células madre ha sido propuesto como una posible vía terapéutica en algunas de las enfermedades neurodegenerativas⁵, también lo ha sido para la ELA⁶.

Las células madre (SC, *stem cells*) son células multipotenciales que son capaces tanto de reproducirse a sí mismas como bajo determinadas condiciones o señales evolucionar a diferentes tipos celulares del organismo. El posible papel de las SC en la terapéutica frente a lesiones traumáticas o por enfermedad ha sido planteado en los últimos años, pero en la ELA la mayoría de los autores establecen como argumento para justificar su estudio el trabajo de Clement et al.⁷, donde se demuestra que las motoneuronas con la mutación que expresan la proteína SOD1 anómala sobreviven más dependiendo del entorno, hipótesis apoyada por Boillee et al. en que modifican la supervivencia de la enfermedad experimental al intervenir sobre la microglia⁸. En consecuencia, si se modificara el entorno a través de la sustitución celular podría modificarse la evolución de la enfermedad.

Como cualquier área de investigación en desarrollo, la información creciente va permitiendo delimitar los beneficios que pueda representar. Por ello la terapia celular incluye hoy diferentes estrategias que no deben valorarse uniformemente. Se han utilizado diferentes orígenes celulares para poder implantar células con objetivos terapéuticos: las SC embrionarias derivadas de la lámina interna de los blastocitos, las SC germinales obtenidas del cordón umbilical y las células adultas que proceden de tejidos específicos que tienen una mayor capacidad de diferenciación, como células de la médula ósea, células mesenquimales, células del sistema hematopoyético, células del tejido graso o células de la piel, especialmente estas últimas, que podrían ser una buena fuente celular, ya que en la dermis se encuentran células precursoras neurales para la epidermis. Lo que se pretende es que a partir de estas células madre, mediante estímulos específicos, se consiga la diferenciación a células neurales adultas y/o bien que se produzcan factores para impedir el avance de la enfermedad.

Hasta recientemente se creía que la neurogénesis sólo se completaba durante las fases del desarrollo y que no se producían neuronas posnatalmente; sin embargo, hoy sabemos que no es así, ya que se han identificado nuevas neuronas en los bulbos olfatorios y en el hipocampo, lo que es debido a la existencia de células madre que están proliferando toda la vida y dando lugar a las nuevas neuronas. Uno de los hallazgos más interesantes de los últimos años ha sido precisamente identificar estas células tanto morfológicamente como molecularmente, siendo células emparentadas con la glía radial y que expresan la proteína *Glial Fibrillar Acidic Protein* (GFAP), característica de astrocitos. Estas células se localizan alrededor de todos los ventrículos, incluido el canal de la médula espinal, pero donde son muy activas es

junto a la zona subventricular (SVZ). Aunque también se encuentran en zonas alejadas de los ventrículos como es la porción subgranular del hipocampo^{9,10}. Las células de la SVZ son capaces de diferenciarse *in vitro* preferentemente en neuronas en presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) o en astrocitos en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Mientras que el uso de las células embrionarias presenta importantes dudas desde un punto de vista ético, la principal dificultad de la utilización de las células neurales (NSC) adultas en terapéutica son su menor disponibilidad y su menor capacidad proliferativa¹¹.

Las dificultades de unas y otras han generado el desarrollo de líneas celulares en el laboratorio que puedan ser implantables y en las que se pueden estudiar sus mecanismos de diferenciación. Así, por ejemplo, se han obtenido líneas celulares procedentes de cultivos celulares de carcinoma que son modificados mediante factores añadidos al mismo, lo que ha permitido una mayor disponibilidad de células¹². La línea celular más desarrollada es la línea Ntera 2/D, que procede de un cultivo de células procedentes de teratocarcinoma y que dan lugar a las células NT2-N, de estirpe neuronal, que a su vez en presencia de ácido retinoico dan lugar a las células hNT, en que perderían su capacidad mitótica y que han sido utilizadas para implantar en modelos experimentales de enfermedades neurológicas¹³. Otra línea celular que ha sido implantada en el sistema nervioso central corresponde a las células Lewis X+CXCR4+, que proceden de una población de NSC a las que se han modificado a través de la incorporación de un receptor específico para citocinas y que tienen la capacidad de diferenciarse *in vivo* en neuronas¹⁴.

Las SC obtenidas tanto en el hombre como en las ratas, sin intervención en el laboratorio, tienen la capacidad de diferenciarse en células neurales específicas cuando se implantan en el áreas del sistema nervioso central (SNC) en desarrollo¹⁵⁻¹⁷, así como en el adulto¹⁸, aunque se ha considerado hasta hace poco que estas células cuando se implantan en áreas no neurogénicas del SNC se mantienen espontáneamente indiferenciadas o se diferencian preferentemente a células gliales¹⁹⁻²² y sólo podrían diferenciarse a otros tipos celulares neurales específicos, por ejemplo, en motoneuronas, si son pretratadas *in vitro*. Éste es un aspecto importante, dado que en el SNC no sólo es necesario llegar a la diferenciación de una célula en la estirpe adecuada sino que debe diferenciarse a un tipo neuronal específico. Diferentes autores han conseguido la diferenciación a motoneuronas desde células SC de origen embrionario²³⁻²⁶. Así, Gao et al. utilizando el modelo animal de axotomía ciática congénita en rata, que supone una desaparición importante de las motoneuronas del asta anterior, han conseguido que células NSC de origen fetal humano implantadas en la médula espinal de rata se diferencien en motoneuronas colinérgicas que envían axones que contactan con miocitos²⁷. Estos axones son mielínicos y las dendritas de las células contactan con cuerpos neuronales del asta anterior. El implante supone una mejoría funcional en la marcha de la rata, lo que apoya la posibilidad del uso de células NSC en enfermedades con

lesión de motoneuronas en el asta anterior con la posibilidad de incorporación de las nuevas motoneuronas a los circuitos neurales central y periférico²⁸, tal como ocurre en otros modelos^{29,30}. Estas células que se van a implantar pueden modificarse genéticamente de forma que se diferencien específicamente en motoneuronas³¹ y parece posible que el implante de motoneuronas diferenciadas desde SC que posteriormente migran al asta anterior y proyectan axones a los músculos^{32,33}. La posibilidad de tratar la ELA a través de la terapéutica a partir de SC ha abierto una amplia línea de investigación en la literatura³⁴.

ESTUDIOS SOBRE TERAPIA CELULAR EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

La información existente se limita a los estudios sobre el modelo experimental de ELA por una mutación genética en rata o ratón³⁵, existiendo muy poca información en humanos, que aparece resumida en la tabla 1. Janson et al.³⁶ administraron por vía intratecal células de origen hematopoyético a tres pacientes con ELA, sin observarse mejoría clínica ni efectos adversos entre 6 y 12 meses tras la administración. Por el contrario, Manzini et al.³⁷ han administrado células procedentes de médula ósea en siete pacientes con ELA, inyectándolas directamente en la médula espinal a través de un método quirúrgico a nivel de D7-D9. Con mínimos efectos adversos, como disestesias y dolor intercostal, dos de los pacientes mejoraron de la fuerza a los 3 meses, mientras que el resto empeoró. Este estudio ha sido cuestionado éticamente desde algunos foros³⁸⁻⁴⁰. Una actualización reciente de los datos de este estudio no ha mostrado resultados alentadores⁴¹. Recientemente, siete pacientes han sido trasplantados por Huang et al. con células SVZ-NSC de origen fetal y analizados con resonancia magnética-espectroscopia, mostrándose una mejoría en dos⁴².

Los hallazgos de la investigación en animales son poco uniformes, como puede observarse en la tabla 2. Ende et al.⁴³ utilizan células mononucleares humanas procedentes del

cordón umbilical y demuestran que se alarga la supervivencia del animal; este aumento de supervivencia es mayor si se utiliza irradiación y si se usan grandes cantidades de células⁴⁴. Willing et al.⁴⁵ han implantado células hNT en el ratón transgénico en fase presintomática mediante implante directo en el parénquima de la médula espinal de forma bilateral a nivel de L4-L5, dando lugar al retraso en el inicio de los síntomas de la enfermedad. Garbuzova-Davis et al.⁴⁶, del mismo grupo, realizan el mismo experimento, pero en animales con inicio de los síntomas, mostrando un retraso de la evolución, aunque sin afectar a la supervivencia. En un estudio posterior⁴⁷, de nuevo con células hNT implantadas en la médula lumbar del ratón transgénico G93A con un seguimiento del animal de experimentación a largo plazo se demuestra un aumento de la supervivencia y retraso de la enfermedad; el seguimiento de los animales en este estudio se realizó durante un largo periodo de tiempo. En otro estudio este grupo⁴⁸ utiliza SC humanas procedentes del cordón umbilical y las administra al ratón transgénico G93A presintomático por vía intravenosa, produciendo un retraso en la evolución de la enfermedad en al menos 3 semanas e incrementando la supervivencia. Las células implantadas sobreviven al menos 10 semanas, migran al cerebro y a la médula y se diferencian en células que expresan marcadores neuronales y gliales. Corti et al.⁴⁹ utilizan células procedentes de médula ósea administradas periféricamente y encuentra un discreto aumento de la supervivencia comparable con el que se obtiene con el uso del riluzol, datos similares a los hallados por Zhao et al.⁵⁰. En este mismo grupo, Corti et al.⁵¹ han implantado motoneuronas colinérgicas generadas *in vitro* en la médula espinal del ratón transgénico G93A con ELA, mostrando un retraso en la evolución de la enfermedad y aumento de la supervivencia. Huang et al.⁵² utilizan células procedentes de la médula ósea por vía intravenosa en ratones hembra y prueban un aumento de la supervivencia. Por el contrario, Habisch et al.⁵³ utilizan células mesenquimales procedentes de médula ósea y células procedentes de cordón umbilical, así como células neuroectodérmicas diferenciadas administradas intratecalmente, que se implantan en bajo número en la médula sin obtener

Tabla 1		Estudios en humanos sobre terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica		
Autor/año	Tipo celular	Número de pacientes	Vía de administración	Resultado
Janson, 2001 ³⁶	Procedentes de médula ósea	3	Intratecal	No mejoría
Manzini, 2003 ^{37, 41}	Procedentes de medula ósea	7	Implante quirúrgico en médula espinal (D7-D9)	Dos pacientes mejoraron y cinco empeoraron a los 3 meses
Huang, 2007 ⁴²	NSC olfatorias fetales	7	Implante quirúrgico	Mejoría en dos pacientes a través de RM-espectroscopia
RM: resonancia magnética; NSC: células madre neurales.				

Tabla 2 Estudios de eficacia sobre terapia celular en el modelo experimental de esclerosis lateral amiotrófica

Autor/año	Tipo celular	Modelo	Vía de administración	Evolución	Supervivencia
Ende, 2000 ⁴³	Células mononucleares de origen umbilical humanas	Ratón G093A presintomático	Intravenosa	Retraso en el inicio	Aumento de 11 días. Aumento de 21 días con irradiación
Chen, 2000 ⁴⁴	Células mononucleares de origen umbilical humanas	Ratón G093A presintomático	Intravenosa. Dosis elevadas de células	Retraso	Aumento de 39 días
Willing, 2001 ⁴⁵	Células hNT	Ratón G093A presintomático	Implante en L4-L5 bilateral	Retraso en el inicio. Mejora de la función motora	No evaluada
Garbuzova-Davis, 2001 ⁴⁶	Células hNT	Ratón G093A sintomático	Implante en la médula lumbar L4-L5	Retraso en la progresión	No aumento de supervivencia
Garbuzova-Davis, 2002 ⁴⁷	Células hNT	Ratón G093A presintomático	Implante en la médula lumbar L4-L5	Retraso en el inicio de 3 semanas	Aumento de 29 días
Garbuzova-Davis, 2003 ⁴⁸	SC de origen umbilical humanas	Ratón G093A presintomático	Intravenosa	Retraso en la progresión de 2-3 semanas	Aumento
Corti, 2004 ⁴⁸	Células de médula ósea de rata	Ratón G093A presintomático modificado para tolerancia. Células médula ósea	Administración intraperitoneal	Retraso en el inicio. Mejora de la función motora	Aumentó la supervivencia 12 días
Huang, 2006 ⁵²	Células de médula ósea de ratón macho	Ratón hembra G093A presintomático	Administración intravenosa	Retraso en el inicio de 5 semanas	Aumento de 5 semanas
Xu, 2006 ⁵⁴	NSC humanas de origen fetal	Rata G093A	Implante en médula lumbar	Retraso	Aumentó más de 10 días
Habisch, 2007 ⁵³	SC umbilical, SC de médula ósea humanas	Ratón G093A presintomático	Administración intratecal	Antecede la clínica en hembras trasplantadas con células de médula ósea. No influencia	No influencia
Corti, 2007 ⁵¹	NSC. Lewis X+. CXCR4+	Ratón G093A	Implante en médula espinal	Retraso significativo	Aumentó más de 23 días
Zhao, 2007 ⁵⁸	Células mesenquimales humanas	Ratón G093A presintomático	Administración intravenosa	Retraso significativo	Aumento de 18 días

ELA: esclerosis lateral amiotrófica; SC: células madre; NSC: células madre neurales.

mejoría ni en la evolución ni en la supervivencia, incluso observan que en las hembras la clínica presintomática antecede en las trasplantadas a los controles. Por otra parte, Xu et al.⁵⁴ implantan células NSC de origen embrionario en la médula lumbar de ratas transgénicas G93A, que se diferencian en parte en neuronas que forman sinapsis con neuronas del huésped que descargan factores de crecimiento, mostrando un aumento en la supervivencia de la enfermedad.

También ha sido evaluado el implante de células de Sertoli procedentes del testículo. En un experimento realizado

por Hemendinger et al. implantaron estas células en la médula espinal en el ratón transgénico G93A y los estudiaron histológicamente tras la evolución de la enfermedad, comparando el lado implantado con aquel que no había recibido el mismo, mostrando que el primero había preservado un mayor número de motoneuronas y que había mayor densidad en la cercanía del implante⁵⁵. La conclusión de estos trabajos no es que se reemplacen las neuronas perdidas, sino impedir que la enfermedad progrese. Esto puede representar un paso importante a la espera de nuevos avances en la neurorregeneración.

¿EXISTE NEURORREPARACIÓN ESPONTÁNEA EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA?

La descripción de la existencia de células NSC adultas y cómo éstas proliferan espontáneamente en determinadas situaciones patológicas ha planteado la posibilidad de abrir nuevas opciones terapéuticas, ya que estas células podrían ser utilizadas para reemplazar a aquellas que degeneran. Aunque estas células han sido descritas inicialmente en la zona subventricular de los ventrículos laterales y el tercer ventrículo, se han podido observar en otras áreas del sistema nervioso central. Así se ha sugerido⁵⁶⁻⁵⁸ y posteriormente demostrado la existencia de células NSC en la médula espinal⁵⁹, situadas en la sustancia blanca de la médula y junto al canal medular⁶⁰. La existencia de estas células tendría sentido como continuación en todo el neuroeje de las células halladas en la zona subventricular.

Estas células NSC obtenidas del canal medular cervical de la rata adulta se agregan en forma de neuroesferas *in vitro*⁶¹ ante la presencia de determinados factores de crecimiento (EGF y FGF2). *In vivo*, estas células proliferan y pueden observarse entre 6 días y 7 semanas tras la administración de dichos factores, no habiéndose observado la migración de estas células alejándose hacia la periferia del canal medular como consecuencia de la administración de los mismos⁶². Estas células NSC están situadas en el estrato subependimario del canal medular⁶³⁻⁶⁶, lo que se ha denominado la zona subependimaria periventricular (EZ). Aunque inicialmente no se había podido demostrar que estas células se diferenciaban a neuronas como consecuencia de la administración de dichos factores a neuronas contrariamente a lo que ocurre en el área subventricular, y este hecho se había atribuido a que pueden existir factores locales que inhiben esta diferenciación o que no existen factores específicos que la promuevan; en estudios posteriores con modelos experimentales con lesiones medulares sí se ha observado la diferenciación a neuronas⁶⁷, aunque de forma muy limitada⁶⁸⁻⁷¹, y en mayor medida en la ELA.

La cuestión es si en la ELA existe proliferación espontánea de las células NSC-EZ de la médula espinal o de otro tipo de células NSC fuera de ella. En el ratón transgénico 693A se ha observado que existe proliferación de células precursoras en el tronco cerebral a los 30 y 60 días de vida significativamente superior a los controles y aquellas que se diferencian lo hacen mayoritariamente a astrocitos y en menor grado a neuronas⁷². De igual forma, en el ratón transgénico se observa la proliferación de células en la SVZ, incluso en la fase presintomática⁷³.

En la médula espinal existe asimismo la proliferación de células NSC-EZ como consecuencia de lesiones compresivas medulares⁷⁴⁻⁷⁶ y en el modelo transgénico de ELA⁷⁷. La administración intratecal de EGF y FGF2 suponen la proliferación de la población de células precursoras neurales y su diferenciación a astrocitos en el canal medular en la rata⁷⁸ en un modelo de compresión medular mediante clip⁷⁹ y en

el modelo transgénico de ELA⁸⁰. En el modelo transgénico de ELA Chi et al.⁷⁷ obtienen una importante información de cómo se desarrolla la respuesta de las células NSC-EZ a la neurodegeneración producida por la ELA a través de modificarlo, dotándolo de la posibilidad de producir una proteína marcadora de la proliferación. El estudio muestra que existe una proliferación aumentada de las células NSC-EZ en la médula espinal en la ELA, que estas células migran desde la zona EZ al asta posterior de la médula y posteriormente al asta anterior y que existe una diferenciación de las células NSC-EZ a neuronas y no a astrocitos u oligodendrocitos. Chi et al.⁷⁷ consideran que en la ELA, a través del modelo transgénico, se incrementa la proliferación de las células NSC-EZ como respuesta a la neurodegeneración, por lo que aumentan en número las células NSC en la zona subependimaria y en astas anteriores y posteriores, aunque en estas últimas las células ya no son proliferantes, siendo mayor el número en las astas posteriores. La proliferación y la migración están aumentadas en los estadios presintomáticos y es máxima al inicio de la enfermedad. Para Chi et al.⁷⁷ es muy interesante la dirección de la migración, ya que es opuesta a la descrita durante el desarrollo y en período neonatal y distinta a la que ocurre en la rata adulta sana. Es difícil de explicar cómo afectando la neurodegeneración a las motoneuronas del asta anterior en la ELA las células NSC-EZ migran primariamente y predominantemente al asta posterior y solamente posteriormente al asta anterior. Estos autores⁷⁷ también resaltan que a diferencia de lo que ocurre en la rata sana, en el desarrollo y como consecuencia de una lesión medular traumática, en la ELA las células NSC-EZ se diferencian casi exclusivamente a neuronas y que el porcentaje de células diferenciadas aumenta con la progresión de la enfermedad. Todo ello hace suponer que en la ELA, al menos en el modelo transgénico sobre la mutación de la SOD1, se produce una respuesta celular específica a la neurodegeneración y que el conocimiento de qué factores pueden mediar dicha respuesta podría permitir una aproximación terapéutica a la enfermedad. Una hipótesis sobre los mediadores bioquímicos de este mecanismo se podría basar en la nestina cuya expresión se ha encontrado más presente en las áreas del asta anterior con mayor afectación en dicho modelo experimental⁸¹, que es una proteína que se expresa en la división celular en los estadios precoces del desarrollo del SNC y que tras la diferenciación deja de tener un papel reconocido, pero que su expresión se reinduce en el adulto en situaciones patológicas del SNC⁸².

DISCUSIÓN

Diferentes estudios han sugerido que la expresión de la SOD1 anómala en las motoneuronas por sí sola es insuficiente para el desarrollo de la enfermedad y que es necesaria la participación de las células no neuronales^{83,84}. Especialmente interesante es el trabajo de Clement et al., que demuestra que para que exista degeneración neuronal es preciso que junto al acúmulo de SOD1 anómala exista participación de las células no neuronales⁷, ya que cuando las neuronas car-

gadas con acúmulos de SOD1 están rodeadas de células no neuronales normales no degeneran y si ocurre la lesión en el caso de neuronas sin acúmulos de SOD1 rodeadas de células no neuronales con acúmulo de SOD1 anómala. Estos autores sugieren, en consecuencia, que debe existir una neurotoxicidad indirecta procedente de las células no neuronales que tienen SOD1 anómala⁷, y ello ha sustentado la idea del posible beneficio de la terapia celular en la ELA. A pesar de ello hay un escaso conocimiento del papel de la glía en las enfermedades neurodegenerativas⁸⁵ aunque se demuestre gliosis y reacción astrocitaria en muchas de ellas y activación de la microglia⁸⁶ como en la ELA⁸⁷. Efectivamente, algunas observaciones ya favorecían la existencia de la intervención del entorno en la patogénesis de la enfermedad, ya que se describen inclusiones hialinas similares a los cuerpos de Lewy en astrocitos procedentes de tejidos de algunos pacientes con formas familiares de ELA⁸⁸⁻⁹⁰ y en los modelos animales transgénicos del ELA^{91,92}. También se habían descrito inclusiones en la oligodendroglia en un modelo transgénico⁹³. La hipótesis más consistente sería que la expresión de la proteína mutante en las células no neuronales supone el ambiente necesario y facilita los efectos dañinos de la SOD1 anómala en las motoneuronas. Una amplia proporción de las células no neuronales en el asta anterior de la médula son astrocitos, que tienen el papel en el mantenimiento del ambiente homeostático. Se ha descrito una disminución de las proteínas transportadoras de glutamato, GLT1 y EAAT2, en la glía de la médula y la corteza de pacientes con ELA⁹⁴ y en animales transgénicos que expresan la SOD1 anómala⁹⁵, observándose que la SOD1 anómala reduce la actividad de la EAAT2⁹⁶, cuya alteración también ha sido descrita en pacientes con ELA esporádica⁹⁴. Asimismo es destacable que el bloqueo de los receptores AMPA suponen una reducción de la agregación proteica y la muerte neuronal *in vitro*⁹⁷, lo que apoyaría esa idea.

Aunque el mecanismo de sustitución de células es el argumento que justifica la investigación de SC en la ELA, existen otros potenciales efectos de la terapéutica celular como la acción neuroprotectora a través de la producción de factores de crecimiento por las células. Así, por ejemplo, algunos autores han sugerido que el posible beneficio que supondría el implante de SC es debido al papel de factores de crecimiento producidos por las células implantadas⁹⁸, por ejemplo, el *Glial Cell Line-derived Nerve Growth Factor* (GDNF), que se produce tras la diferenciación en células de estirpe glial⁹⁹. Nayak et al.³⁴ han revisado ampliamente los potenciales factores de crecimiento que pueden ser producidos por las células NSC y que pueden tener un papel beneficioso en la evolución del modelo experimental de ELA como son el GDNF^{100,101}, *Insulin-like Growth factor-I* (IGF1)^{102,103}, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)¹⁰⁷, *Cardiotrophin-1* (CT-1)¹⁰⁸, *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF)^{109,110}, *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Neurotrophin 3* (NT3) o *Pleiotrophin* (PTN)¹¹¹. Klein et al.¹⁰¹ y Suzuki¹¹² et al. han implantado SC neurales con capacidad de segregar GDNF al ratón transgénico G93A.

Sin embargo, para poder interpretar la información existente en la literatura y la posible utilidad de la terapia celular en el tratamiento de los enfermos con ELA es necesario considerar diferentes cuestiones metodológicas. En primer término hay que señalar que la enfermedad de motoneurona que sufren los roedores transgénicos G93A no coincide en muchos aspectos con la ELA humana, ni la esporádica ni la genética. Se trata de una enfermedad de motoneurona que afecta básicamente a la motoneurona inferior, con menor afectación de la motoneurona superior y las vías corticoespinales como sucede en la ELA humana. Contrariamente a lo que ocurre en ésta, la ELA del roedor transgénico G93A se inicia en las extremidades inferiores y por tanto la lesión en el asta anterior de la médula lumbar es importante en el desarrollo de la enfermedad, de forma que muchos de los implantes que se han realizado han buscado esta ubicación. Otro aspecto importante es el momento del implante, ya que en el ratón transgénico existe la posibilidad de realizarlo en la fase presintomática, en el inicio de la enfermedad o en la fase sintomática y obviamente la interpretación de los resultados de los ensayos debe depender del momento de evolución de la enfermedad.

Todavía es controvertido si las células NSC implantadas *in vivo* se diferencian adecuadamente para que sirvan en la repoblación de las motoneuronas dañadas en la ELA, aunque sí serían capaces de hacerlo *in vitro*¹¹³. Se ha considerado que tras un implante en la médula, la estirpe predominante en la diferenciación es la astrocitaria; parece claro que depende del lugar donde se realiza el implante y por tanto de factores locales. Así, los implantes cercanos a las meninges se diferencian en astrocitos o permanecen como células pluripotenciales, mientras que los implantes en sustancia gris evolucionan a neuronas y oligodendrocitos. En este sentido algunos autores han mostrado cómo esas neuronas serían colinérgicas y por tanto podrían sustituir a las células dañadas; otros autores¹¹⁴ han demostrado que la gran mayoría de las neuronas diferenciadas son gabaérgicas y sólo una parte pequeña colinérgicas. En la médula las neuronas gabaérgicas tienen la función de interneuronas y son bipolares, contrariamente a las colinérgicas, que son multipolares y lanzan sus axones hacia la periferia. Otro aspecto importante es si esas nuevas neuronas consiguen realizar conexiones con otras células y sus axones llegan a realizar conexiones neuromusculares. Mientras algunos autores han observado esa posibilidad, no existe un convencimiento de que ello sea así. Para Yan et al.¹¹⁴ las neuronas del implante realizan efectivamente conexiones con otras neuronas nuevas a través de una neurotransmisión gabaérgica, reciben conexiones con neuronas del huésped a través de una neurotransmisión glutamatérgica y realizan conexiones con neuronas del animal injertado a través de una neurotransmisión gabaérgica.

Como cualquier terapéutica, los resultados van a depender de la dosis administrada, es decir, del número de células implantadas, así como la vía de administración. Habisch⁵³ administra 100.000 células por animal siguiendo la

experiencia de Corti et al.⁵⁰ y éste, a su vez, de estudios precedentes en lesiones de médula espinal. La comparación de los estudios de Ende⁴³ y Chen⁴⁴ muestran cómo el número de células administradas influye en el resultado; sin embargo, los criterios de establecimiento del tamaño del injerto han sido empíricos por parte de los investigadores en la gran mayoría de los estudios. En relación con la vía de administración del implante se ha utilizado desde la administración, intravenosa o intratecal, al trasplante intraventricular o al implante en el parénquima. El uso de la vía intravenosa para la administración de las células progenitoras ha sido sugerido con resultados contradictorios, aunque algunos autores observan que a través de dicha administración las células son capaces de migrar a la médula espinal y posteriormente diferenciarse¹¹⁵. Por otra parte, la situación anatómica de la médula espinal, más cercana al canal medular que otras áreas del SNC, han sugerido que la administración intratecal podría ser una fórmula menos invasiva de administración aplicado tanto a lesiones medulares como de raíces nerviosas¹¹⁶. Backshi et al. han probado que la administración de células de origen mesenquimal por esta vía en ratas con lesión medular permite una mayor diferenciación que la administración por vía intravenosa al analizar el tejido medular resultante^{117,118}. La administración intratecal de SC neurales de origen embrionario en ratas con lesión traumática cervical ha demostrado que las células sobreviven 5 semanas en el canal, migran a través de la médula utilizando la sustancia blanca y son capaces de diferenciarse en los tres tipos celulares maduros del SNC¹¹⁹. La administración intraventricular de células precursoras ha probado su supervivencia y su capacidad de migrar en parte a los tejidos lesionados. Wu et al. inyectan en el cuarto ventrículo y en la cisterna magna neuroesferas procedentes de hipocampo fetal de la rata, observando que las células que circulan a través de los espacios aracnoideos sobreviven en acúmulos celulares sobre la piamadre medular¹²⁰. Estos acúmulos van aumentando de tamaño durante los primeros 5 días, entran en la médula espinal situándose alrededor de los vasos sanguíneos, migran al área lesional y se integran en ella, diferenciándose en parte en astrocitos¹²¹. Contrariamente, si se administran SC no neurales de origen embrionario a través del cuarto ventrículo se observa que las células desaparecen a las 3 semanas, aunque podrían ejercer un efecto beneficioso en las lesiones medulares en la rata a través de la producción de factores tróficos en el líquido cefalorraquídeo o por contacto con los tejidos lesionados en la rata¹²². Por último, el implante en el parénquima es el método más usado. La administración de células precursoras puede realizarse a través de un implante estereotáctico en el lugar lesional o en lugares considerados estratégicos. Así, el implante de SC procedentes del cordón umbilical en un modelo de lesión medular ha supuesto la supervivencia de las células hasta 5 semanas después del implante, aunque posteriormente entraron en apoptosis¹²³. Estudios en lesiones medulares tanto agudas como subagudas han mostrado cómo las células sobreviven y se diferencian¹²⁴. Implantes múltiples en la médula espinal con células hNT muestran que éstas producen fibras en los lugares implantados¹²⁵. Una cuestión relevante

en la ELA, especialmente en humanos, es que no se conoce el lugar más adecuado del implante debido a la variabilidad clínica, e incluso en el modelo de rata o ratón transgénicos la decisión de implantar en la médula lumbar está basada exclusivamente en criterios empíricos. En todo caso, el implante local probablemente garantiza definir mejor el potencial beneficio de la terapéutica.

Para poder comparar los resultados de los diferentes estudios es necesario tener en cuenta si el modelo experimental ha sido el mismo. En algunos de los estudios realizados con ratones presintomáticos se encuentra una disociación entre las variables estudiadas al mostrar que existe un retraso significativo del inicio de la enfermedad sin que aumente la supervivencia frente a los ratones controles. Para Corti et al.⁵¹ ello implicaría que los mecanismos del inicio de la enfermedad en el ratón G69A serían distintos a aquellos que influirían en la supervivencia. Sin embargo, la proteína SOD1 anómala es degradada por la ubiquitina del citoplasma de la motoneurona, y se ha comprobado en cultivos celulares que al reducir su actividad se produce un aumento de la expresión de la proteína anómala, argumento que justifica el inicio tardío de la ELA en humanos dado que la función proteosómica disminuye con el envejecimiento¹²⁶ y por tanto deberíamos entender que aquellos estudios en que no se modifica la supervivencia deberían ser considerados como negativos.

Un aspecto diferencial es el relativo al potencial rechazo inmunológico de las células implantadas. Aunque algunos de los estudios no encuentran reacciones celulares de rechazo, el tiempo corto entre la realización del implante y el sacrificio del animal no permite concluir que no exista rechazo, y ello debe ser considerado al tratar de extrapolar la experiencia animal en un futuro a los humanos. El uso de células humanas en modelos experimentales ha supuesto además un rechazo heterólogo que tiene sus consecuencias en el injerto¹²⁷. Yan et al.¹¹⁴ al examinar lo que ocurre al comparar los resultados de los implantes en médula espinal en ratas inmunodeprimidas han hipotetizado que la respuesta inmune al rechazo supone una modificación en el número de células diferenciadas, produciéndose un número menor de neuronas nuevas tras el implante, una menor diferenciación a neuronas y un menor número de conexiones. Asimismo han demostrado que el uso de inmunosupresores implica no sólo una mayor supervivencia del injerto, sino de los animales¹¹⁴, aunque no todos los inmunosupresores son eficaces en prevenir las consecuencias del rechazo^{100,128-130}. A pesar de ello, una parte destacable de los estudios se han realizado sin inmunosupresión¹³¹, sin que se haya analizado los sesgos que ello puede representar.

CONCLUSIONES

La investigación sobre la potencial utilización de la terapia celular en el abordaje de la ELA está en progresión y los diferentes estudios realizados son poco homogéneos. Por ello quedan muchas preguntas por responder como cuál el

es tipo de células más adecuado para implantar y cuál debe ser el volumen del implante para conseguir el mejor resultado, cuál es la vía de implantación y en el caso de implantes intraparenquimatosos, cuál debe ser el lugar del implante o cuál es la necesidad de administración de sustancias concomitantes, especialmente los inmunosupresores para trasplantes heterólogos, aunque algunas SC, especialmente de origen en médula ósea, se ha postulado que tienen un efecto inmunosupresor propio. El posible papel de las células troncales adultas como respuesta a la enfermedad está por definir. Por otra parte, la extrapolación de los resultados del modelo animal al humano no puede ser directa porque los condicionantes son distintos y la evolución también¹³². En todo caso parece todavía prematuro iniciar la investigación en humanos hasta no disponer de muchas de estas respuestas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance gris et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epineire. Arch Physiol Neurol Pathol 1869;2:744.
2. Matías-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Vela A, Guerrero A. Epidemiología descriptiva en esclerosis lateral amiotrófica. Neurología 2007;22:368-80.
3. Mulder D, Kurland L, Offord K, Beard C. Familiar adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 1986; 36:511-7.
4. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familiar amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993;362:59-62.
5. Lindvall O, Kokaia Z, Martínez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. Nat Med 2004;10(Suppl.):S42-50.
6. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Pollo L. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 2004;364:200-2.
7. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, García ML, Boillee S, Rule M, et al. Wild-type non neuronal cells extended survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science 2003; 302:113-7.
8. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science 2006;312: 1389-92.
9. Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 1999;97:703-16.
10. Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. *In vivo* clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. Development 1998; 125:2251-61.
11. Hermann A, Maisel M, Liebau S, Gerlach M, Kleger A, Schwartz J, et al. Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. J Neurochem 2006;98: 629-40.
12. Samberg PR, Willing AE, Cahill DW. Novel cellular approaches to repair of neurodegenerative diseases from Sertoli cells to umbilical blood stem cells. Neurotox Res 2002;4:95-121.
13. Newman MB, Misiuta I, Willing AE, Zigova T, Karl RC, Borlongan CV, et al. Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells. Stem Cells Dev 2005;14:29-43.
14. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, del Bo R, Fortunato F, et al. Multipotentiality, homing properties, and pyramidal pathogenesis of CNS-derived Le (sea-1)+/CXCR4+ stem cell. FASEB J 2005;9:1860-2.
15. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Willis AM, Billingham LL, et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. Nat Biotechnol 1998;16:1033-9.
16. Brustle O, Choudhary K, Karam K, Küttner A, Murray K, Dubois-Dalcq M, et al. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. Nat Biotechnol 1998;16:1040-4.
17. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001;19:1129-33.
18. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature 1996;383:624-7.
19. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J Neurosci 2000;20:8727-35.
20. Fricker RA, Carpenter MK, Winckler C, Greco C, Gates MA, Björklund A. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. J Neurosci 1999;19:5990-6005.
21. Sheen VL, Arnold MW, Wang Y, Macklis JD. Neural precursor differentiation following transplantation into neocortex is dependent on intrinsic developmental state and receptor competence. Exp Neurol 1999;158:47-62.
22. Pallini R, Vitiani LR, Bez A, Casalbore P, Facchiano F, Di Giorgi Gerevini V, et al. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. Neurosurgery 2005; 57:1014-25.
23. Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2005;23:215-21.
24. Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone RM. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. J Neurosci 2004;24:7848-58.
25. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell 2002;110:385-97.
26. Wu P, Tarasenko Y, Gu Y, Huang LM, Goggeshall RE, Yu Y. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. Nat Neurosci 2002;5:1271-8.
27. Gao J, Goggeshall RE, Tarasenko Y, Wu P. Human neural stem cell derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. Neuroscience 2005;131:257-62.
28. Gao J, Goggeshall RE, Cheng JM, Wang J, Wu P. Functional motoneurons develop from human neural stem cell transplants in adult rats. Neuroreport 2007;18:565-9.

29. Craff MN, Zeballos JL, Johnson TS, Ranka MP, Howard R, Mortarjem P, et al. Embryonic stem cell-derived motor neurons preserve muscle after peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:235-45.
30. Deshpande DM, Kim YS, Martínez T, Carmen J, Dike S, Shats I, et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol* 2006;60:32-44.
31. Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, Kurokawa MS, Watanabe K, Sakakibara M, et al. Introduction of the MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2006;22:509-22.
32. Soundararajan P, Lindsey BW, Leopold C, Rafuse VF. Easy and rapid differentiation of embryonic stem cells into functional motoneurons using sonic hedgehog-producing cells. *Stem Cells* 2007;25:1697-796.
33. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, et al. Human neural stem cell differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14069-70.
34. Nayak MS, Kim Y, Goldman M, Keirstead HS, Kerr DA. Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1138-762.
35. Galán L, Vela A, Guerrero A, Barcia JA, García-Verdugo JM, Matías-Guiu J. Modelos experimentales en esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología* 2007;22:381-8.
36. Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:913-5.
37. Mazzini L, Fagiolini L, Boccattelli R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, et al. Stem cells therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2003;4:158-61.
38. Silani V, Leigh N. Stem cell therapy for ALS: hope and reality. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2003;4:8-10.
39. Swash M. Stem cell therapy in human ALS. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2003;4:133-4.
40. Mitchel JD, Borasio CG. Amyotrophic lateral Sclerosis. *Lancet* 2007;369:2031-41.
41. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo L, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cells treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* Doi 10.1016/j.jns.2007.05.016.
42. Huang H, Tank K, Chen L, Xue Y, Wang H, Xi H, et al. MR spectroscopy evaluation and short-term outcome of olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2007;21:52-7 (abstract).
43. Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci* 2000;67:53-9.
44. Chen R, Ende N. The potencial for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *J Med* 2000;31:21-30.
45. Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Mlikem M, Cahill DW, Sanberg PR. hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 2001;56:525-30.
46. Garbuzova-Davis S, Willing A, Milliken M, Saporta S, Sowerby B, Cahill DW, et al. Intraspinal implantation of hNT neurons into SOD1 mice with apparent motor deficit. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2001;2:175-180.
47. Garbuzova-Davis S, Willing A, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill T, et al. Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTERA 2/D1 cell line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2002;174:169-80.
48. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:255-70.
49. Corti F, Locatelli S, Donadoni C, Glugieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, et al. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A-ALS mice and contribute to CNS, heart, and skeletal muscle tissues. *Brain* 2004;127:2518-32.
50. Zhao CP, Zhang C, Zhou SN, Xie YM, Wang YH, Huang H, et al. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy* 2007;9:414-26.
51. Corti S, Locatelli F, Papadimitrou D, del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, et al. Neural stem cells Lewis X+ CXCR4+ modify disease progression in a amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain* 2007;130:1289-305.
52. Huang H, Zhang C, Zhao CP, Yao XL, Xi J. Effect of transplantation of wild-type bone marrow in mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006;28:562-6 (abstract).
53. Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habisch A. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J Neurol Transm* 2007; DOI 10.1007/s00702-007-0748-y.
54. Xu L, Yan J, Chen D, Welsh AM, Hazel T, Johe K, et al. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* 2006;82:865-75.
55. Hemmendinger R, Wang J, Malik S, Persinski R, Copeland J, Emerich D, et al. Sertoli cells improve survival of motor neurons in SOD1 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2005;196:235-43.
56. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-33.
57. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls, and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-20.
58. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 1996;175:1-13.
59. Martens DJ, Seaberg RM, Van Der Kooy D. *In vivo* infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur J Neurosci* 2002;16:1045-57.
60. Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, et al. Proliferation and differentiation of progenitor

- cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2000;20:2218-28.
61. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuraxis. *J Neurosci* 1996;16:7599-609.
 62. Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 2001;172:115-27.
 63. Laywell ED, Kukekov VJ, Steindler DA. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted post-mortem intervals. *Exp Neurol* 1999;156:430-3.
 64. García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 1998;36:234-48.
 65. Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, Van der Kooy D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 1999;19:4462-71.
 66. Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97:703-16.
 67. Alexanian AR, Crowe MJ, Kurpad SN. Efficient differentiation and integration of lineage-restricted neural precursors in the traumatically injured adult cat spinal cord. *J Neurosci Met* 2006;150:41-6.
 68. McTigue DM, Wei P, Stokes BT. Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 2001;21:3392-400.
 69. Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 2005;50:247-57.
 70. Horky LL, Galimi F, Gage FH, Horner PJ. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol* 2006;498:525-38.
 71. Yang H, Lu P, McKay HM, Bernot T, Keirstead H, Steward O, et al. Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26:2157-66.
 72. Juan L, Dawei Z, Julie AD. Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide-dismutase 1 (G93A-G1H) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2007;29:204-9.
 73. Liu Z, Martin LJ. The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. *J Comp Neurol* 2006;497:468-88.
 74. Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in adult rat. *Neurosci* 2005;131:177-87.
 75. Takahashi M, Arai K, Kurosawa H, Sueyoshi N, Shirai S. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:185-94.
 76. Ke Y, Chi L, Xu R, Luo C, Gozal D, Liu R. Early response of endogenous adult neural progenitors cells to acute spinal cord injury in mice. *Stem Cells* 2006;24:1011-9.
 77. Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B, et al. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 2006;24:34-43.
 78. Kojima A, Tator CH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes cause epidermal and functional recovery in spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma* 2002;19:223-38.
 79. Kojima A, Tator CH. Intratecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 cause proliferation of ependymal precursor cells in the adult rat spinal cord in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:687-97.
 80. Otha Y, Nagai M, Nagata T, Murakami T, Pagano I, Nagai H, et al. Intratecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in spinal cord of mice with mutant human SOD1 gene. *J Neurosci Res* 2006;84:980-92.
 81. De Hemptinne I, Boucherie C, Pochet R, Bantubungui K, Schiffmann SN, Maloteaux JM, et al. Unilateral induction of progenitors in the spinal cord of hSOD1(G93A) transgenic rats correlates with asymmetrical hind limb paralysis. *Neurosci Lett* 2006;40:25-9.
 82. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005;20:665-71.
 83. Pramatarova A, Laganier J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 2001;21:3369-74.
 84. Lino MM, Scheneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 2002;22:4825-32.
 85. Miller DW, Cookson M, Dickson DW. Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neuron Gial Biol* 2004;1:13-21.
 86. Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med* 2002;34:491-500.
 87. Mc Geer PL, Mc Geer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscl Nerv* 2002;26:459-70.
 88. Kato S, Hayashi H, Nakashima K, Nambo E, Kato M, Hirano A, et al. Pathological characterization of astrocytic hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1997;151:611-20.
 89. Kate S, Takikawa M, Nakashima K, Hirano A, Cleweland DW, Kusaka H, et al. New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2000;1:163-679.
 90. Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brannstrom T, Gredal O, et al. Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase 1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2004;127:73-88.
 91. Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, et al. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1 containing inclusions. *Neuron* 1997;18:327-38.

92. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Omaha E, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998;281:1851-4.
93. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perykarya of mice expressing the SOD1 (G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;177:114-23.
94. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38:73-84.
95. Howland DS, Liu J, Sche Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1604-9.
96. Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Hedinger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 1999;2:427-33.
97. Roy J, Minoti S, Dog L, Figlewicz DA, Durham HD. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 1998;18:9673-84.
98. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;181:115-29.
99. Cabanes C, Bonilla S, Tabares L, Martinez S. Neuroprotective effect of adult hematopoietic stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration. *Neurobiol Dis* 2007;26:408-18.
100. Klein SM, Behrstock S, Mc Hugh J, Hoffmann K, Wallace K, Sasaki M, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gen Ther* 2005;16:509-21.
101. Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9771-5.
102. Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003;301:839-42.
103. Gorio A, Lesma E, Madashi L, Di Giulio AM. Co-administration of IGF-1 and glycosaminoglycans greatly delays motor neuron disease and affects expression in the wobbler mouse: a long term study. *J Neurochem* 2002;12:193-202.
104. Zheng C, Nennesmo I, Fadeel B, Henter JL. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 2004;56:564-7.
105. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004;429:413-7.
106. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greensberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11946-50.
107. Sun W, Funakoshi H, Nakamura T. Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 2002;22:6537-48.
108. Mitumoto H, Klinkosz B, Pioro EP, Tsuzaka K, Ishiyama T, O'Leary RM, et al. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease. *Muscl Nerv* 2001;24:769-77.
109. Feeney SJ, Austin L, Bennett TM, Kurek JB, Jean François MJ, Muldoon C, et al. The effect of leukaemia inhibitory factor on SOD1 G93A murine amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 2003;23:108-18.
110. Azari MF, Lopes EC, Stubna C, Turner BJ, Zhang D, Nicola NA, et al. Behavioural and anatomical effects of systemically administered leukaemia inhibitory factor in the SOD1 (G93A G1H) mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 2003;982:92-7.
111. MIR R, Chen W, Höke A. Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;104:4664-9.
112. Suzuki M, McHugh J, Tork C, Sélér B, Klein SM, Aebischer P, et al. GDFN secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle in a rat model of familial ALS. *Plos One* 2007; Doi 10.1371/0000689.
113. Zhao CP, Zang C, Wang YH, Zhou SN, Zhou C, Li WY, et al. Signals in pathological CNS extracts of ALS mice promote hMSC neurogenic differentiation *in vitro*. *Cell Biol Int* 2007.
114. Yan J, Xu L, Welsh AM, Chen D, Hazhel T, Johe K, et al. Combined immunosuppressive agents or CD4 antibodies prolong survival of human neural stem cells graft and improve disease outcomes in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Stem Cells* 2006;24:1976-85.
115. Fujiwara I, Tanaka N, Ishida O, Fujimoto Y, Marakami T, Kahihara H, et al. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate of the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 2004;366:287-91.
116. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Kataoka M, Chou H, Ishikawa N, et al. Implantation of neural stem cells via cerebrospinal fluid into the injured root. *Neuroreport* 2004;15:1249-53.
117. Bakshi A, Hunter C, Swanger S, Lepore A, Fisher I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of lumbar puncture technique. *J Neurosurg Spine* 2004;1:330-7.
118. Bakshi A, Barshinger AL, Swanger S, Madhavani V, Shumsky JS, Neuhuber B, et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive stem cell transplantation. *J Neurotrauma* 2006;23:55-65.
119. Lepore A, Bakshi A, Swanger S, Rao MS, Fisher I. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res* 2005;1045:206-16.
120. Wu S, Suzuki S, Kitada M, Katoaka K, Kitaura M, Chou H, et al. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neurosci Lett* 2002;318:81-4.
121. Bai H, Suzuki Y, Noda T, Wu S, Kataoka K, Kitada M, et al. Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat: a method for cell transplantation. *J Neurosci Meth* 2003;124:181-7.
122. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka M, et al. Bone marrow stromal cells injured into the cerebrospinal fluid

- promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004;187:266-78.
123. Dasari VR, Spomar DG, Li L, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *Neurochem Res* 2007:
 124. Parr AM, Kultbaski I, Tator CH. Trasplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cell for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2007;24:835-45.
 125. Garbuzova-Davis S, Willing A, Saporta S, Justen EB, Misiuta IE, Dellis J, et al. Multiple transplants of hNT cells into spinal cord of SOD1 mouse model of familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler other Motor Neuron Disord* 2006; 7:221-6.
 126. Grieb P. Transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *Folia Neuropathol* 2004;42:239-48.
 127. Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 1996;76:775-89.
 128. Li P, Tessler A, Hass SS, Fischer I, Rao MS, Sezler ME. Fate of immortalized human neuronal progenitor cells transplanted in rat spinal cord. *Arch Neurol* 2005;62:223-9.
 129. Karlsson J, Fong KS, Hansson MJ, Elmer E, Csiszar K, Keep MF. Life span extension and reduced neuronal death after weekly intraventricular ciclosporin injections in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosurg* 2004;101:128-37.
 130. Anneser JM, Gmerek A, Gerkrath J, Borasio GD, Heumann R. Immunosuppressant FK506 does not exert beneficial effects in symptomatic G93A superoxide dismutase 1 transgenic mice. *Neuroreport* 2001;12:2663-5.
 131. Hendriks WA, Pak ES, Owensby JP, Menta KJ, Glazova M, Morretto J, et al. Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviours and restore function following spinal cord injury in mice. *Mol Med* 2006;12:34-46.
 132. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patients's bedside: an update of clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211:27-35.